



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

Fe(III)에 선택적으로 작용하는
indolizino[3,2-*c*]quinoline 기반의
형광 센서의 개발

The development of Fe(III) selective
fluorescent sensors based on
indolizino[3,2-*c*]quinoline scaffold

2018 년 2 월

서울대학교 대학원
약학과 약품제조화학 전공
백 병 엽

Fe(III)에 선택적으로 작용하는 indolizino
[3,2-*c*]quinoline 기반의 형광 센서의 개발

The development of Fe(III) selective
fluorescent sensors based on
indolizino[3,2-*c*]quinoline scaffold

지도교수 이 지 연

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함

2018 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약품제조화학 전공

백 병 엽

백 병 엽 의 석사학위논문을 인준함

2018 년 2 월

위 원 장 _____ (인)

부 위 원 장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초록 (ABSTRACT)

철(Fe)는 체내에서 전자 이동, 질소 고정, 산소 이동, 세포 대사와 같은 많은 부분에 참여하는 중요한 미량 원소이다. 따라서 시료 속에서 미량의 철을 정성적, 정량적으로 분석하는 방법은 중요시 되고 있으며, 특히 Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 는 서로 하는 역할이 다르기 때문에 이 둘을 구분하는 기술이 요구된다. 시료 속 미량 금속을 분석하는 방법에는 electrochemical, inductively coupled plasma emission spectroscopy, inductively coupled plasma mass spectroscopy, atomic absorption spectroscopy 등과 같은 것들이 있지만, 사용이 복잡하다는 단점이 있다. 이런 단점을 개선하기 위해 Fe^{2+} 또는 Fe^{3+} 에 선택적으로 작용하는 형광 센서들이 많이 개발 되었다. 하지만 기존에 개발된 형광 센서들 대부분은 rhodamin, fluorescein, Cy2와 같은 fluorophore의 유도체에 한정되어 있었다.

본 연구실에서 최근에 발표된 indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ)은 기존에 연구되지 않은 새로운 골격의 물질로서, 관능기의 변화에 의해 다양한 absorbance과 fluorescence spectrum을 가짐을 보고한바 있다. 본 연구에서는 합성된 indolizino[3,2-*c*]quinoline 유도체들의 특정 금속에 의한 형광 변화를 측정함으로써 선택적으로 Fe^{3+} 를 sensing하는 indolizino[3,2-*c*]quinoline 골격의 새로운 형광 센서를 개발하였다. Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 를 구별할 수 있고, 특정 위치에 존재하는 관능기 유무에 따라서 철 이온에 대하여 turn-off, turn-on의 서로 상방된 경향을 가지는 센서를 개발하였다. 또한 C6 위치에 heterocycle이 존재하지 않을 경우 비선택적으로 여러 금속에 대해 형광 변화가 나타난다는 것을 규명하였다. 더

나아가 본 연구에서 개발된 indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ) 형광 센서는 세포 imaging과 같은 생물학적 응용에 사용될 수 있을 것이라 기대한다.

주요어: Fluorescent sensor (형광 센서), Chemical sensor (화학적 센서), indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ), Fe^{3+}

학번: 2016-21823

Table of Contents

서론.....	1
실험 결과	8
1. Initial screening of indolizino [3,2- <i>c</i>]quinolines	8
1.1 Metal screening in H ₂ O	9
1.2 Solvent screening.....	11
2. Ratiometric fluorescent sensor, IQ18.....	14
2.1 Absorption and fluorescence spectra.....	14
2.2 Selectivity test	16
2.3 Competition test	19
2.4 Binding property.....	22
2.4.1 Dissociation constant between IQ18 and Fe ³⁺ ...	22
2.4.2 Limit of detection of IQ18 for Fe ³⁺	23
2.4.3 Stoichiometry between IQ18 and Fe ³⁺	25
2.5 Reversibility.....	26
2.6 Binding mode	27
3. Turn-on fluorescent sensor, IQ44	37
3.1 Absorption and fluorescence spectra.....	37
3.1.1 Spectra in ethanol	37
3.1.2 Spectra in H ₂ O.....	38
3.1.3 Optimization of excitation wavelength.....	40
3.1.4 Increment of fluorescence of IQ44 without Fe ³⁺	41
3.2 Selectivity test	42
3.2.1 Selectivity test in ethanol.....	43

3.2.2 Selectivity test in H ₂ O	45
3.3 Competition test	47
3.3.1 Competition test in ethanol.....	47
3.3.2 Competition test in H ₂ O	49
3.4 Binding property	50
3.4.1 Dissociation constant between IQ44 and Fe ³⁺ ...	50
3.4.1.1 Dissociation constant in ethanol.....	51
3.4.1.2 Dissociation constant in H ₂ O.....	52
3.4.2 Limit of detection of IQ44 for Fe ³⁺	54
3.4.3 Stoichiometry between IQ44 and Fe ³⁺	55
3.5 Binding mode	57
3.5.1 Proposed binding model based on NMR spectra	57
3.5.2 Proposed binding model based on XRD	60
4. Structure–Function Relation.....	62
4.1 The role of ester group at B–ring	62
4.2 The role of heterocycle at E–ring	65
결론 및 고찰.....	67
Experimental Section.....	71
1. Instrument and materials	71
2. Synthesis of IQ18 and IQ44	72
2.1 General procedure.....	72
3. Formation of organometallic complex.....	72
4. Synthesis of N–methylated IQ18, IQ18–S	74
5. Single crystal X–ray crystallography	75

5.1 Single crystal X-ray crystallography of IQ18	75
5.2 Single crystal X-ray crystallography of IQ44	76
6. UV-vis and fluorescence spectra measurement	77
Reference	78
Supporting information	87
1. Initial screening of IQ derivatives	87
2. Ratiometric fluorescent sensor, IQ18	95
2.1 Competition test	95
2.2 Benesi-Hildebrand plot (Raw data)	96
2.3 Fluorescence spectra of Job's plot	97
2.4 Fluorescence spectra of reversibility test	97
2.5 NMR spectra	98
3. Turn-on fluorescent sensor, IQ44	101
3.1 Fluorescence spectrum of IQ44	101
3.2 Selectivity test	102
3.3 Competition test	104
3.4 Dissociation constant between IQ44 and Fe^{3+}	105
3.5 NMR spectrum	106
APPENDIX	109
1. Original NMR spectra	109
영문 Abstract	131

그림 목차

그림 1	Molecular structure of some siderophores	3
그림 2	Schematic representation of various types of fluorescent sensors	4
그림 3	Fe ³⁺ selective fluorescent sensor based on rhodamin B	5
그림 4	Structure of indolizino[3,2- <i>c</i>]quinoline and fluorescence spectra	6
그림 5	Intracellular imaging of IQs compared with lysotracker	7
그림 6	Solvent screening of IQ18	12
그림 7	Solvent screening of IQ44	13
그림 8	Change of absorption spectrum of IQ18	14
그림 9	Change of fluorescence spectra of IQ18	16
그림 10	Selectivity test of IQ18	18
그림 11	Competition test of IQ18 excited at 461 nm	20
그림 12	Competition test of IQ18 excited at 400 nm	21
그림 13	Benesi-Hildebrand plot of IQ18	23
그림 14	Calibration curve of ratiometric fluorescent sensor, IQ18	24
그림 15	Job's plot between IQ18 and Fe ³⁺	25
그림 16	Reversibility test of IQ18 using EDTA	27
그림 17	¹ H NMR titration study of IQ18 in CD ₃ OD	28

그림 18	^1H NMR spectral analysis; IQ18, IQ18-S, IQ18-Fe in $\text{DMSO}-d_6$	31
그림 19	$^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESY NMR spectral analysis; IQ18, IQ18-Fe	34
그림 20	ORTEP diagram of IQ18	35
그림 21	Change of absorption and fluorescence spectrum of IQ44 in ethanol	37
그림 22	Change of absorption and fluorescence spectrum of IQ44 in H_2O	39
그림 23	Fluorescence spectra of IQ44 excited at 440 nm	41
그림 24	Change of fluorescence spectra of IQ44 without Fe^{3+}	42
그림 25	Selectivity test of IQ44 in ethanol	44
그림 26	Selectivity test of IQ44 in H_2O	46
그림 27	Competition test of IQ44 in ethanol	48
그림 28	Competition test of IQ44 in H_2O	49
그림 29	Relaxation method plot of IQ44 in ethanol	51
그림 30	Benesi-Hildebrand plot of IQ44 in H_2O	52
그림 31	Calibration curve of IQ44 in H_2O	54
그림 32	Titration study using absorption spectra of IQ44 in H_2O	56
그림 33	^1H NMR titration study of IQ44 in CD_3OD	57
그림 34	^1H NMR spectral analysis; IQ44, IQ44-Fe in $\text{DMSO}-d_6$	59
그림 35	ORTEP diagram of IQ44	61

그림 36	Metal screening of IQ44, IQ42, IQB28, IQB27 in ethanol	63
그림 37	Metal screening of IQ44, IQ42, IQB28, IQB27 in H ₂ O	65
그림 S1	Change of fluorescence spectra of IQ11 with various metal cations in H ₂ O	87
그림 S2	Change of fluorescence spectra of IQ42 with various metal cations in H ₂ O	88
그림 S3	Change of fluorescence spectra of IQ44 with various metal cations in H ₂ O	89
그림 S4	Change of fluorescence spectra of IQ52 with various metal cations in H ₂ O	90
그림 S5	Change of fluorescence spectra of IQ18 with various metal cations in H ₂ O	91
그림 S6	Change of fluorescence spectra of IQ53 with various metal cations in H ₂ O	92
그림 S7	Change of fluorescence spectra of IQ25 with various metal cations in H ₂ O	93
그림 S8	Change of fluorescence spectra of IQ18 with various metal cations in ethanol	94
그림 S9	Competition test of IQ18 excited at 400 nm (First addition: Fe ³⁺)	95
그림 S10	Competition test of IQ18 excited at 400 nm (First addition: Other ions)	96

그림 S11	Change fluorescence spectra of IQ18 upon the addition of Fe^{3+}	96
그림 S12	Fluorescence spectrum upon the ratio of IQ18	97
그림 S13	Raw fluorescence spectrum of reversibility test of IQ18	97
그림 S14	^1H - ^1H COSY, NOESY spectral analysis of IQ18 in $\text{DMSO}-d_6$	98
그림 S15	^1H - ^1H COSY, NOESY spectral analysis of IQ18-Fe in $\text{DMSO}-d_6$	99
그림 S16	^1H - ^1H COSY, NOESY spectral analysis of IQ18-S in $\text{DMSO}-d_6$	100
그림 S17	Change in the fluorescence spectra of IQ44 excited at 370 nm	101
그림 S18	Selectivity test of IQ44 excited at 417 nm in ethanol	102
그림 S19	Selectivity test of IQ44 excited at 430 nm in H_2O	103
그림 S20	Competition test of IQ44 in ethanol and H_2O (First addition: Fe^{3+})	104
그림 S21	Fluorescence intensity of IQ44 at 450 nm against $[\text{Fe}^{3+}]$ in ethanol and H_2O	105
그림 S22	Observed rate constant (k_{obs}) against $[\text{Fe}^{3+}]$ in H_2O	105
그림 S23	^1H - ^1H COSY, NOESY spectral analysis of IQ44 in $\text{DMSO}-d_6$	106

그림 S24	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectral analysis of IQ44-Fe in DMSO- d_6	107
--------	---	-----

반응 목차

Scheme 1	Synthesis of indolizino [3,2-c] quinoline derivatives	8
----------	--	---

표 목차

표 S1	Gap of chemical shift between IQs and IQ-Fe complex	108
------	--	-----

서론

전이 금속(transition metal) 이온들은 의약품, 생명과학, 산업, 환경, 그리고 건강까지 포함한 넓은 분야에서 중요한 역할을 하기 때문에 미지의 시료 속에서 원하는 금속 이온을 선택적으로 존재 유무를 알아내거나 정량하는 방법이 꾸준한 관심을 받아왔다. 기존에 알려진 분석 방법에는 spectrophotometry²⁻³, inductively coupled plasma mass spectrometry⁴, voltammetry⁵⁻⁶, atomic absorption spectroscopy⁷와 같은 것들이 있다. 하지만, 이런 방법들은 원하는 target 이온 외에도 다른 금속 이온들에 의한 방해도 있을 뿐 아니라 비싸고 사용이 복잡한 기기를 필요로 한다는 단점이 있다. 이러한 기기에 적합한 시료를 만들기 위해 반드시 복잡한 전처리(pre-treatment)가 필요하다는 것도 큰 단점들 중 하나이다. 이런 분석의 불편함과 한계점을 넘어서기 위해 등장한 방법이 형광 (fluorescence)을 이용하는 것이다. Target ion과 만났을 때, 변화를 관찰하는 fluorescent sensor 방법이 있다. 형광 측정은 실험적으로 측정 기기의 사용이 매우 단순하기 때문에 편리하다는 장점이 있으며, target 이온에 대한 반응이 빠르기 때문에 실시간으로 형광의 변화를 관찰 할 수 있다는 장점이 있다.⁸⁻¹⁰

수많은 금속 이온들 중에서 철(iron)이 중요 금속 이온들 중 하나로 꼽히는 이유는 체내에 가장 많이 존재하는 전이 금속일 뿐 아니라 그만큼 많은 역할을 하기 때문이다. 실제로 철 이온은 전자 이동 (electron transfer), 산소의 운반과 저장 (oxygen-carrying/storage), 세포 대사 (cellular metabolism), 효소 반응 (enzymatic reaction) 등과 같은 곳에 사용된다. 따라서 철 이온의 양이 체내에 과량으로 존재하거나 부족한

경우 다양한 질병을 야기한다. 그 예로 철이 부족한 경우 빈혈¹¹, 간과 신장의 손상¹²⁻¹³, 심장병¹⁴, 그리고 당뇨병¹⁵ 등을 일으킨다고 알려져 있다. 반대로 철이 과잉 존재할 때는 파킨슨병¹⁶⁻¹⁷, 헌팅턴 무도병¹⁸⁻¹⁹, 알츠하이머²⁰⁻²², 그리고 혈색소증²³ 등과 같은 질병을 야기한다고 알려져 있다. 이런 이유들 외에도 철 이온이 중요한 이유는 산화 상태에 따라서 체내에서의 역할이 크게 좌우되기 때문이다.²⁴ 따라서 단순히 철 이온을 target으로 갖는 fluorescent sensor의 개발을 넘어 Fe^{2+} , Fe^{3+} 를 구분하는 sensor의 개발이 필요하였다.²⁵⁻²⁶

자연에서 iron-complex를 이루는 ligand들은 siderophores라는 그룹으로 불리며 현재까지 많은 수가 밝혀졌다(그림 1).²⁷ 이후 밝혀진 siderophores의 구조를 바탕으로 Fe^{3+} 와 선택적으로 complex를 형성하며 형광을 내는 물질들을 개발하였다. 이런 형광 물질들은 공통적으로 chelating unit (Fe^{3+} receptor)과 light-emitting group (fluorophore)를 적당하게 연결한 구조를 가지고 있다.²⁸ Light-emitting group (fluorophore)는 chelating unit에서 Fe^{3+} 와 결합을 하면 형광이 사라지거나 증가하는 등의 변화가 나타나며 이러한 변화를 통해서 정성적, 정량적 분석을 할 수 있다.

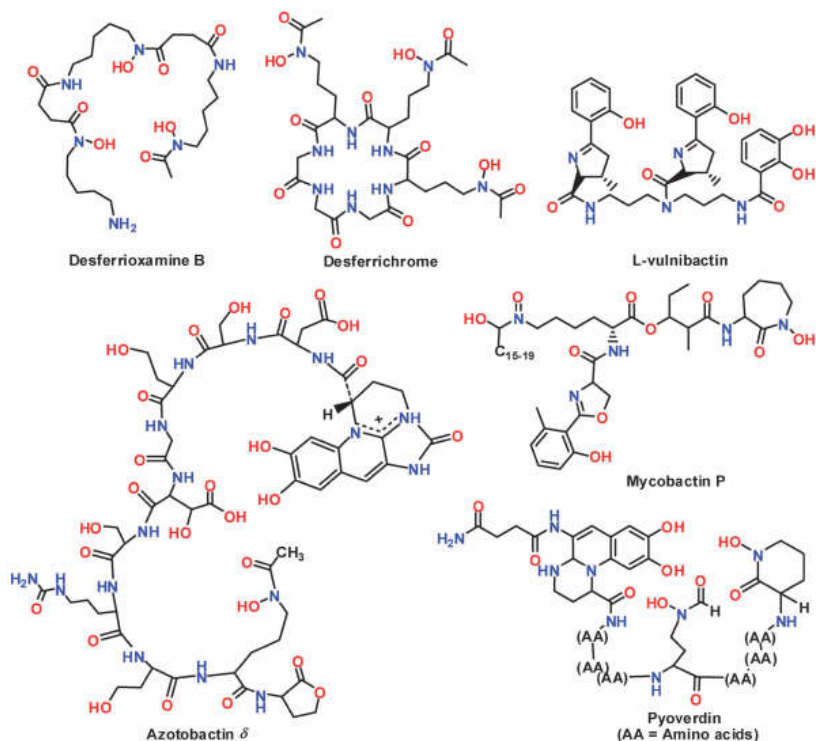


그림 1. Molecular structures of some siderophores¹

Fluorescent sensor는 현상에 따라서 4종류(turn-off, turn-on, ratiometric, chemodosimeter)로 구분할 수 있다(그림 2).¹ 앞의 세 가지는 각각 순서대로 형광의 감소, 형광의 증가, 형광 파장의 이동과 같은 결과를 보여주며 가역적이라는 공통점을 갖는다. 하지만, 마지막 chemodosimeter의 경우 fluorophore가 target과 반응하여 새로운 물질이 형성되고 이 때 생성물이 형광을 나타낸다. 그러므로 이 경우 비가역적이라는 점이 앞의 3종류와 큰 차이점이다.

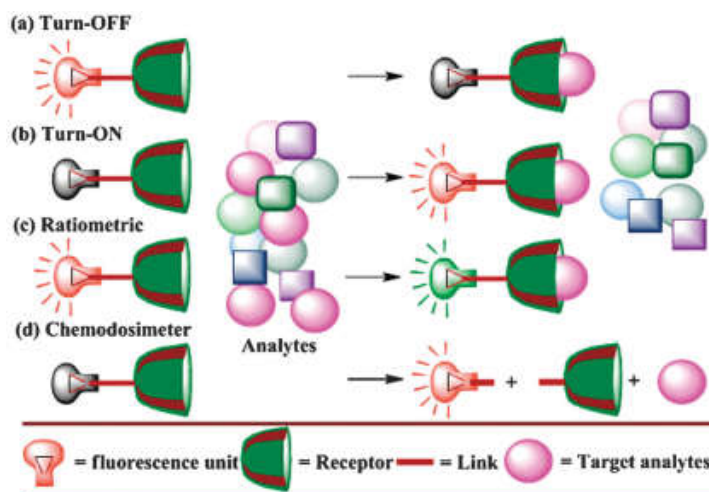


그림 2. Schematic representation of various types of fluorescent sensors¹

일반적으로 사용되는 fluorophore는 rhodamine, fluorescein, Cy2, coumarin 등이 있다. 기존에 발표된 많은 수의 fluorescent sensor는 공통의 fluorophore를 사용하고 chelating unit에 변화를 시도함으로써 target 금속에 선택적일 수 있도록 하였다. 언급한 fluorophore 중에서

rhodamin B는 높은 absorbance와 quantum yield를 가지며 유도체를 합성하는데 있어서 용이하다는 장점 때문에 많이 사용되었다. 따라서 Fe^{3+} 를 target으로 하는 rhodamin B 유도체들(그림 3)이 많이 보고되었으며, 이들을 살펴 보면 lactam의 nitrogen에 연결된 chelating group만 바뀐 것을 알 수 있다.^{26, 29-34}

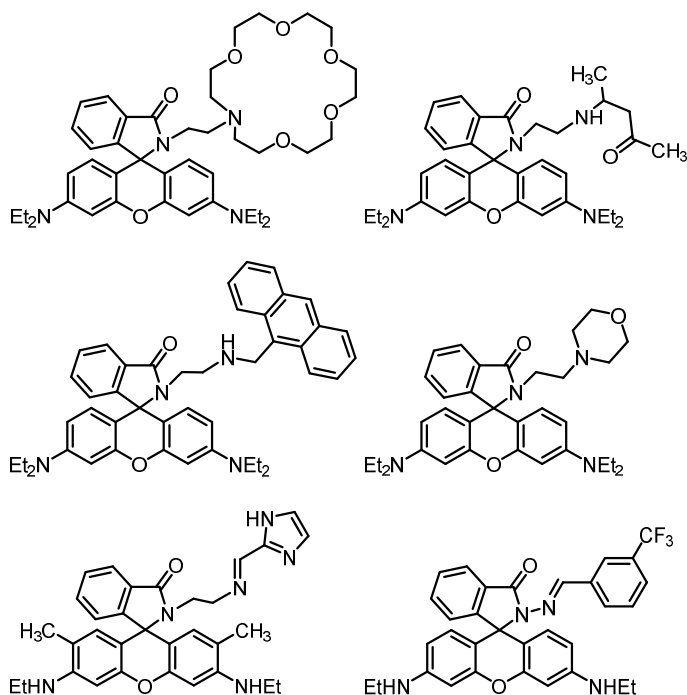


그림 3. Fe^{3+} selective fluorescent sensor based on rhodamin B

본 연구실에서 발표한 indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ)은 기존에 연구되지 않은 새로운 골격의 물질로서, 높은 quantum yield를 갖는다는 장점이 있다. 또한 IQ 골격에 포함된 functional group에 따라서 다양한 absorption spectrum과 fluorescence spectrum을 갖는다. 더 나아가

같은 유도체일지라도 주변 환경에 따라 fluorescence spectrum이 민감하게 변한다는 특징이 있다.³⁵

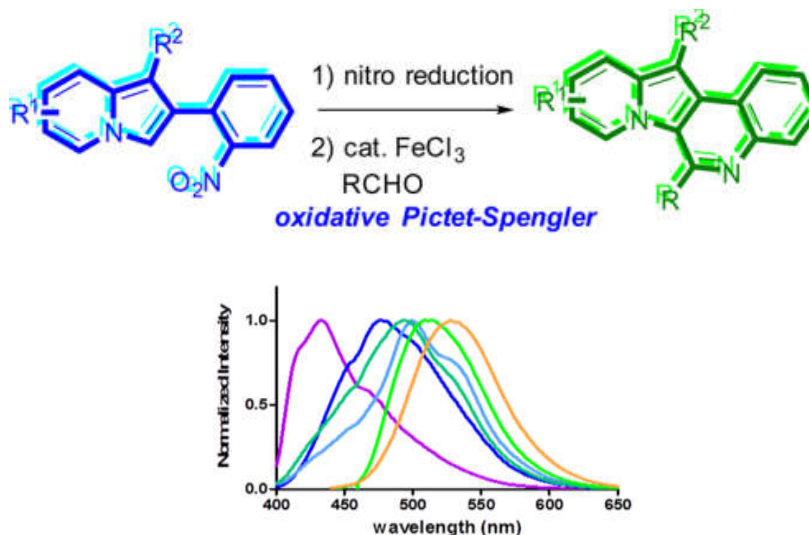


그림 4. Structure of indolizino [3,2-*c*]quinoline and various normalized fluorescence spectra

이러한 광학적 특성 외에도 indolizino [3,2-*c*]quinoline 유도체들은 세포 투과성이 매우 뛰어나다는 장점이 있다. 이러한 점을 응용하여 본 연구실에서는 DNA, RNA, 그리고 lysosome을 target으로 하는 fluorescent probe를 개발하여 발표하였다(그림 5).³⁶ 이러한 장점 외에도 IQ 유도체는 합성하기에 매우 용이하다는 장점이 있다. 특히 본 연구에서 합성한 물질들처럼 E-ring에 다양한 heterocycle을 도입하는 경우, 마지막 oxidative Pictet-Spengler 반응에 사용되는 시약만 다양하게 바꿔주면 되기 때문에 매우 편리하다.

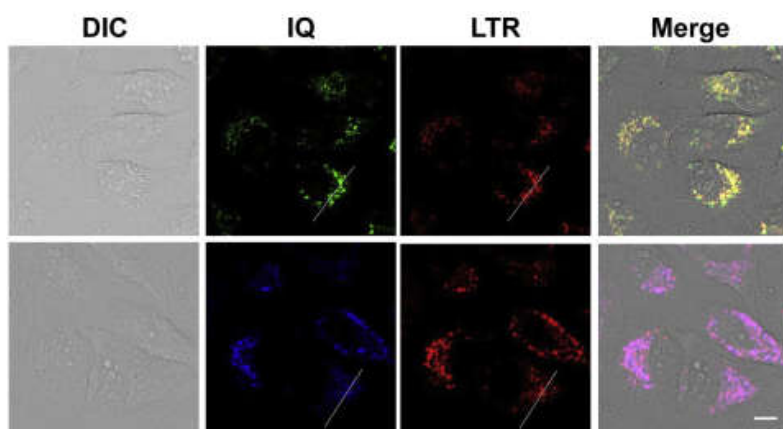
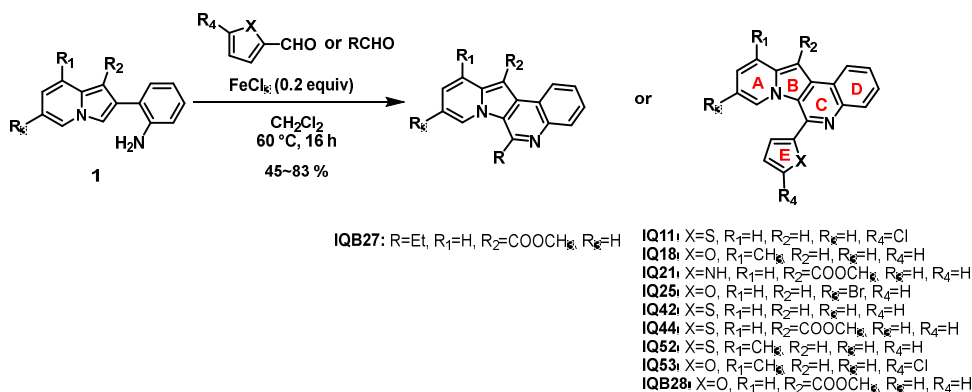


그림 5. Intracellular imaging of IQs compared with lysotracker

본 연구에서는 indolizino[3,2-c]quinoline이 light-emitting group (fluorophore)으로써 fluorescent metal sensor로 활용될 수 있음을 밝혔다. 또한 fluorescent sensor로 사용될 때 IQ 유도체들의 구조와 그 기능간의 상관관계(Structure-Function relationship)을 밝혔다.

실험 결과

1. Initial screening of indolizino[3,2-*c*]quinolines



Scheme 1. Synthesis of indolizino[3,2-*c*]quinoline derivatives

본 연구에서는 기존에 발표되었던 다양한 indolizino[3,2-*c*]quinoline 유도체들³⁵이 fluorescent metal sensor로 활용될 수 있는지 알아보기 위해서, scheme 1을 통해서 합성된 E-ring에 5각형의 heterocycle을 갖는 유도체들을 사용하였다. E-ring에 heteroatom이 존재한다면, C-ring에 존재하는 quinoline moiety의 nitrogen과 함께 chelating unit으로 작용할 수 있을 것이라고 예상하였다.

1.1 Metal screening in H₂O

기존에 발표된 수많은 형광 센서들은 유기용매에서 작동한다는 한계가 있다. 따라서 혈액과 같은 체내 시료는 수용액 상태이므로 유기용매에서만 작동하는 fluorescent metal sensor 물질들의 경우 이러한 시료의 분석에는 사용할 수 없다. 따라서 수용액에서도 금속 이온에 대한 fluorescent sensor로 작용할 수 있는 물질이 있는지 알아보기 위해서 먼저 수용액 상에서 screening을 진행하였다. 본 실험실에서 먼저 발표한 indolizino[3,2-c]quinoline의 논문 데이터 중 각각의 물질들이 수용액에서 보여주는 absorbance spectrum을 참고하여 absorbance 값이 가장 높은 파장을 excitation 파장으로 사용하였다. Screening에 사용한 IQ 유도체들은 E-ring에 존재하는 heterocycle의 종류에 따라서 나눌 수 있으며 thiophene이 있는 IQ11, IQ42, IQ44, IQ52, furan이 붙어있는 IQ18, IQ53, IQ25, 그리고 pyrrole이 붙은 IQ21을 사용하였다. 또한 screening에는 7가지 금속 이온 (Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Pb^{2+})을 사용하였다.

수용액에서 screening을 진행한 결과 사용한 indolizino[3,2-c]quinoline 유도체 9가지 모두 물질 자체의 형광 세기는 매우 약하게 나타났다(그림 S1-그림 S7). 물질 개개의 결과를 살펴보기에 앞서 일반적으로 물질에 halogen원소(Cl, Br)가 있는 경우 기존 발표했던 IQ 논문³⁵에서처럼 형광이 다른 유도체들에 비해 더 낮은 형광 세기를 보여주었다. E-ring에 thiophene이 있는 경우 보다 furan이 존재하는 유도체들이 보다 높은 형광 값을 나타냈다. IQ11은 Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} 사용한 모든 금속에 대해서 형광이 감소하는 모습을

보여주며 선택성을 보여주지 못하였다. IQ42는 7가지 금속들 중 어떤 것에 대해서도 변화를 나타내지 않았다. IQ44는 자체 형광도 DW에서 조금씩 증가하는 모습을 보여줬지만, Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} 를 첨가하였을 때 더 큰 형광의 증가를 보여줬다. 그 중에서도 Fe^{3+} 에서 그 증가량이 매우 크게 나타났다. IQ52는 앞의 IQ11번과 같이 다수의 금속 이온에 대해 선택성이 없이 형광이 감소하였다. IQ18은 IQ52에서 thiophene이 furan으로 바뀐 유도체인데 IQ52보다 조금은 높은 형광 값과 Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} 에 대해서 형광의 감소를 보여주었다. IQ53과 IQ25는 여러 금속 이온에 대해 선택성이 전혀 보이지 않았다. Pyrrole을 갖는 IQ21의 경우 물질 자체의 형광이 수용액에서 증가하였다가 감소하는 모습을 나타냈기 때문에, screening을 진행하지 않았다. IQ41(=IQ5)은 IQ42번의 결과와 같이 어떤 변화도 나타나지 않았다. 이런 결과를 바탕으로 indolizino[3,2-c]quinoline 유도체들 중 비교적 높은 형광 값과 선택성을 보여주는 IQ18이 turn-off 형광 센서로 작용할 수 있다고 생각하였으며, IQ44는 turn-on 형광 센서로 작용할 수 있다고 판단하고 9가지 유도체들 중 이 두 가지 물질을 선택하였다. 그리고 IQ18에 대해서는 수용액처럼 protic solvent면서 유기용매인 ethanol에서 13가지 금속 이온 (Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+})에 대한 metal screening을 진행하였다(그림 S8). 그 결과 수용액보다 ethanol에서 더 변화가 크게 보이는 결과를 얻을 수 있었다. 그러므로 이후 두 물질들이 특정 금속에 대한 fluorescent sensor로 사용할 수 있는지 알아보려고 실험을 진행하였다.

1.2 Solvent screening

수용액에서 screening을 진행 후, 선정된 IQ18, IQ44이 특정 금속 이온에 대한 형광 센서로서 가장 잘 작동할 수 있는 조건을 확인하기 위하여 먼저 solvent screening을 진행하였다. IQ18의 경우 ethanol에서 더 형광 변화량이 크게 나타났기 때문에 solvent screening 실험을 통하여 더 좋은 조건을 찾는 것이 목표였다. Solvent는 6가지(methanol, ethanol, DW, dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO), methanol과 DW의 1:1 혼합 solvent)를 사용하였으며 Fe^{3+} 를 넣기 전과 20당량의 Fe^{3+} 를 넣은 뒤의 형광을 각각 측정하였다.

IQ18에서 solvent screening을 진행한 결과를 살펴보면 DMF와 DMSO같은 aprotic solvent에서는 Fe^{3+} 첨가 전후에 어떠한 변화도 없었지만, protic solvent로 선택한 4가지 solvent에서는 모두 형광의 감소가 나타났다. 4가지 protic solvent 중에서도 IQ18의 형광 세기가 가장 높았던 ethanol에서 큰 폭의 형광 감소가 나타났다 (그림 6).

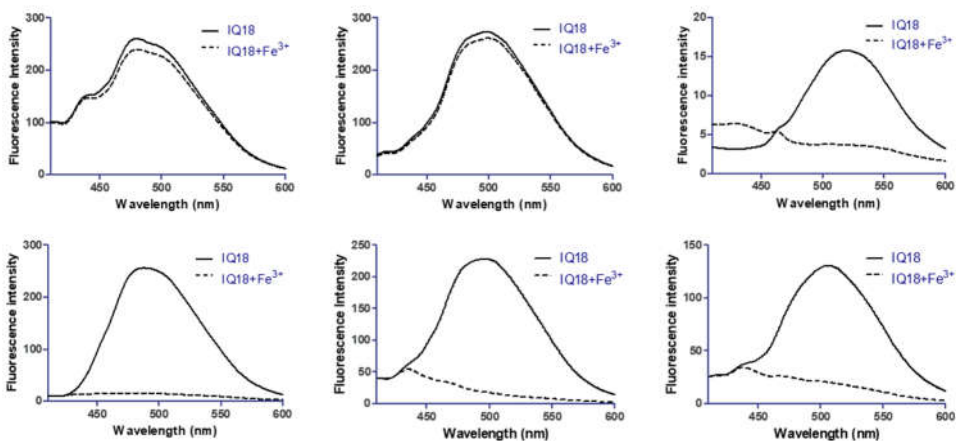


그림 6. Solvent screening for select proper solvent system to investigate the effect of Fe^{3+} on IQ18. The bold line is for IQ18 ($2 \mu\text{M}$) and the dotted line is after the addition of Fe^{3+} ($40 \mu\text{M}$); (a) DMF, (b) DMSO, (c) DW, (d) ethanol, (e) methanol, (f) methanol:DW (1:1) solvent.

IQ44도 Fe^{3+} 을 넣었을 때 가장 큰 변화를 보여주는 조건을 찾기 위해서 solvent screening을 진행하였다 (그림 7). 그 결과를 살펴보면 DMF나 DMSO와 같은 aprotic solvent에서는 형광의 증가나 감소와 같은 변화가 전혀 없는 것으로 나타났지만 protic solvent인 ethanol, methanol, DW, 또는 DW와 methanol이 1:1로 섞여있는 solvent 모두에서 큰 형광의 증가가 나타났으며 이 중 ethanol에서 가장 큰 형광의 증가가 나타났다. 또한 DW에서 측정한 spectrum을 보면 450 nm에서의 형광 값이 6.1에서 121.3까지 약 20배 증가하였다. 증가한 형광의 세기가

ethanol 조건보다는 약하지만 20배의 증가가 있었기 때문에 **IQ44**의 경우 수용액에서도 Fe^{3+} 에 작용하는 fluorescent sensor로 작용할 수 있을 것이라고 예상하였다. 따라서 **IQ18**과 **IQ44** 공통적으로 ethanol에서 이후 실험들을 진행하였으며, **IQ44**에 대해서는 수용액 조건도 추가로 실험하였다.

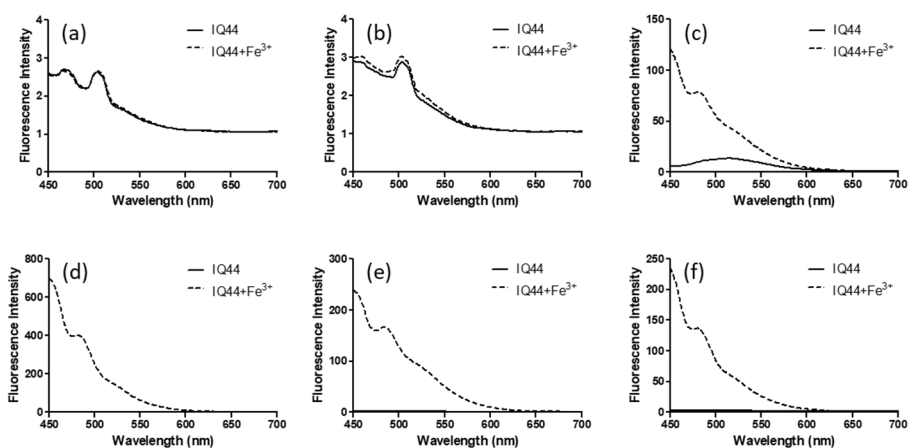


그림 7. Solvent screening for select proper solvent system to investigate the effect of Fe^{3+} on **IQ44**. The bold line is for **IQ44** ($2 \mu\text{M}$) and the dotted line is after the addition of Fe^{3+} ($40 \mu\text{M}$). Spectra of **IQ44** and **IQ44**+ Fe^{3+} was recorded after 30 sec and 5 min respectively; (a) DMF, (b) DMSO, (c) DW, (d) ethanol, (e) methanol, (f) methanol:DW (1:1) solvent; $\lambda_{\text{ex}}=440 \text{ nm}$, slit width=3 nm/5nm.

2. Ratiometric fluorescent sensor, IQ18

2.1 Absorption and fluorescence spectra

IQ18과 Fe^{3+} 사이에 상호작용에 따른 변화를 관찰하기 위해서 Fe^{3+} 을 0 당량에서 10당량까지 첨가하면서 이에 따라 변화하는 UV-vis absorption spectrum과 fluorescence spectrum을 관찰하였다. UV-vis absorption spectrum을 살펴보면 Fe^{3+} 를 첨가하면 할수록 absorption spectrum이 변하는 것을 볼 수 있었으며, 특히 400 nm 파장에서 absorbance이 가장 많이 감소하였고 이와 반대로 461 nm에서 absorbance이 가장 높게 증가하였다 (그림 8a). UV-Vis absorption spectrum에서 461 nm의 absorbance가 점점 증가하는 값을 Fe^{3+} 농도와 함께 plotting한 그래프를 보면, Fe^{3+} 가 1당량 첨가된 이후로 absorbance도의 큰 증가가 없이 saturation이 나타나는 결과를 얻을 수 있었다(그림 8b).

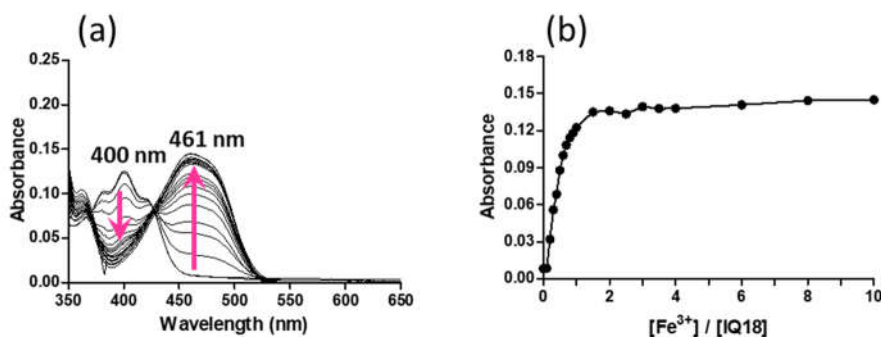


그림 8. Changes in the absorption spectra of IQ18(10 μM) (a), absorbance of IQ18 (10 μM) at 461 nm as a function of Fe^{3+} concentration (b) in ethanol

이어서 fluorescence spectrum의 변화도 관찰하였다(그림 9). Fe^{3+} 를 넣을 수록 absorbance이 감소하였던 400 nm에서 excitation 시키는 경우, 형광의 감소가 나타났다(그림 9a). 특히, 486 nm에서 가장 높았던 형광의 세기가 점점 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 약 5배 감소하였다. 또한 absorbance이 증가하는 461 nm에서 excitation 시킨 경우 471 nm부터 700 nm까지 fluorescence spectrum을 측정하였고 형광이 점점 증가하는 모습을 관찰할 수 있었다(그림 9b). 형광의 증가는 543 nm에서 가장 높게 나타났으며 약 11배 증가하였다. 한 물질 내에서 특정 금속 이온에 대한 작용으로 형광의 증가와 감소가 같이 나타나기 때문에, IQ18이 ratiometric fluorescent sensor라고 예상하였다. 따라서 두 개의 다른 파장에서 excitation 시켜서 얻은 fluorescence spectrum 중 486 nm, 543 nm에서의 형광 값을 Fe^{3+} 농도와 함께 plotting해 보았다 (그림 9c). 그 결과 두 plot이 서로 대칭된 것처럼 나타나는 결과를 얻을 수 있었다.

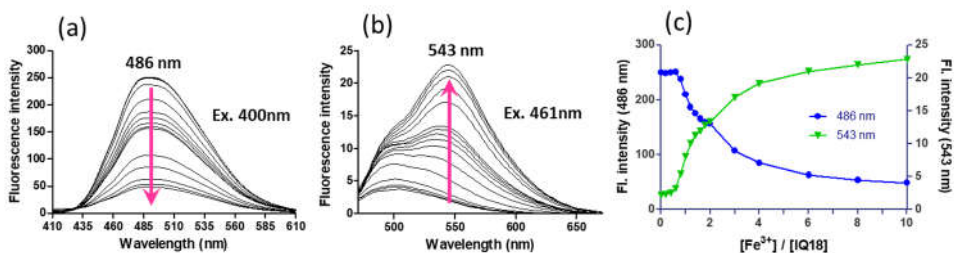


그림 9. Fluorescence emission spectra of **IQ18** (2 μ M) excited at 400 nm (a), 461 nm (b) and the fluorescence intensity of **IQ18** at 486 nm and 543 nm (c) in ethanol solutions with various amounts of Fe^{3+} (0–10 eq.).

2.2 Selectivity test

Fe^{3+} 에 대한 **IQ18**의 selectivity를 확인하기 위해서 여러 금속 이온을 사용한 실험을 진행하였다. Fe^{3+} 를 포함한 총 15가지의 금속 이온들(Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+})을 사용하였다. 형광 세기 변화량이 400 nm에서 excitation 시켰을 때 감소하는 것이 461 nm에서 excitation 시켰을 때 증가하는 것보다 크기 때문에 이번 실험은 400 nm에서 excitation 시켜서 각각의 금속 이온을 첨가하였을 때 형광이 감소하는지 관찰하였다(그림 10).

그 결과 Cu^{2+} 와 Pb^{2+} 에서 약간의 형광 감소가 보였지만, Cr^{3+} 와 Fe^{3+} 를 첨가한 경우에서 나타난 형광의 감소량에 비하면 그 정도가 매우 미미하였다. 따라서, Cr^{3+} 와 Fe^{3+} 을 넣었을 때를 제외하면, 나머지 13가지 금속

이온이 들어간 경우 형광의 변화가 크게 나타나진 않았다고 볼 수 있다. Cr^{3+} 에 대해서도 형광의 감소가 크게 나타난 이유는 다음의 두 가지 이유 때문이다. 첫번째는 둘 다 3가 양이온이라는 것, 두번째는 Cr^{3+} 와 Fe^{3+} 의 이온의 반경은 각각 62, 65 pm로써 거의 비슷하다는 것이다.³⁷ Cr^{3+} 은 혈액, 상피조직, 뼈, 간, 신장, 등 부위마다 존재하는 비율은 다르지만 전체적으로 체내에 존재하는 양이 약 0.4~3 mg이라고 이미 발표되었다.³⁸ 하지만 Fe^{3+} 는 Cr^{3+} 에 비하면 매우 과량 존재한다. 발표된 내용에 따르면 여자의 경우 ~38 mg/kg, 남자는 ~50 mg/kg 체내에 존재하거나 성별에 구분 없이 평균적으로 약 2~4 g³⁹ 존재한다는 것이다. 이러한 점을 고려하면 Cr^{3+} 에 의해서 나타나는 형광의 변화는 실제 활용에 있어서 무시할 수 있을 것이라고 예상한다. 더 중요한 점은 **IQ18**은 Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 를 확실히 구분한다는 점이다. 이는 **IQ18**이 Fe^{3+} 에 대한 fluorescent sensor로써 실질적으로 사용될 수 있는 조건을 충분히 갖추고 있음을 시사한다.

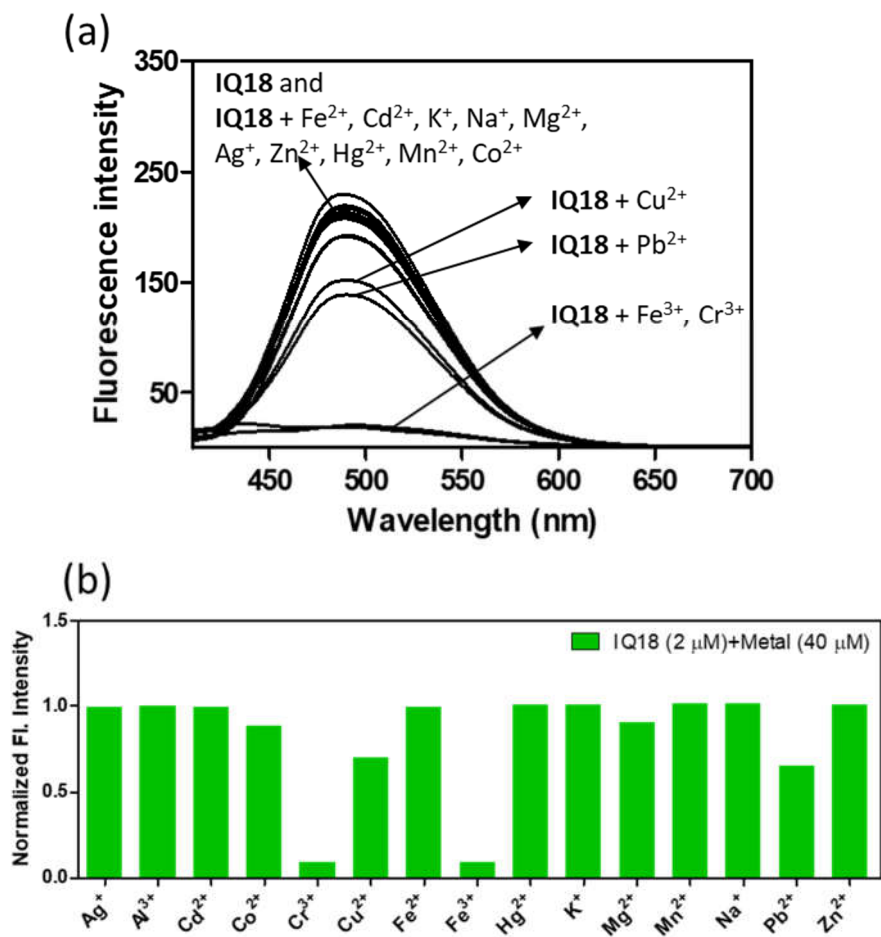


그림 10. Fluorescence response of chemosensor IQ18 (2 μM) in the presence of Fe^{3+} and other metal ions (40 μM) in ethanol solutions (a) and the normalized fluorescence intensity at 486 nm (b). λ_{ex} : 400 nm, Slit width = 3 nm/5 nm

2.3 Competition test

IQ18이 Fe^{3+} 에 대하여 Cr^{3+} 를 제외한 다른 금속 이온들과 비교해보면 충분히 선택성이 있는 것으로 밝혀진 것에 이어서 IQ18과 Fe^{3+} 의 사이의 결합에 대한 competition test를 진행하였다. 이는 다른 금속 이온이 과량으로 존재하는 경우 둘 사이의 결합이 유지되거나 형성되는데 영향을 받는지를 확인하기 위한 실험이다. IQ18은 앞서 언급했던 것과 같이 ratiometric fluorescent sensor이기 때문에 400 nm 또는 461 nm에서 excitation 시켜서 형광의 변화를 관찰할 수 있다. 또한 Fe^{3+} 와 다른 금속 이온들을 첨가하는 순서에 따라서도 조건을 다양하게 바꿀 수 있다. 본 실험에서는 461 nm에서 excitation 시켜서 543 nm에서 형광 세기가 증가하는 모습을 관찰하였다. 사용된 금속 이온들은 Fe^{3+} 에 비해서 과량 존재하는 상태여야 하므로 Fe^{3+} 에 비해서 10배나 많은 양을 사용하여 진행하였다. 측정 순서는 IQ18을 먼저 측정 후 이어서 cuvette에 10 μM Fe^{3+} 를 첨가하고 측정하였다. 그리고 각각의 금속 이온을 100 μM 첨가하여 형광을 측정하였다(그림 11). 그 결과 IQ18에 Fe^{3+} 를 첨가한 후 눈에 띄게 증가하였던 fluorescence spectrum이 다른 금속들의 첨가 이후에도 계속 유지되고 있다는 점이였다. 400 nm에서 excitation 시킨 경우에도 Fe^{3+} 이 10 μM 이 들어가자마자 형광이 quenching 되었고, 다른 금속 이온을 과량 (100 μM) 넣어도 형광이 회복되거나 증가하는 모습은 관찰할 수 없었다(그림 S9). 이 결과는 IQ18이 Fe^{3+} 와 결합을 형성한 이후에는 과량의 다른 금속이 존재한다 할지라도 풀어지지 않는다는 것을 의미한다. 즉 둘 사이에는 강한 결합을 하고 있다고 유추할 수 있다.

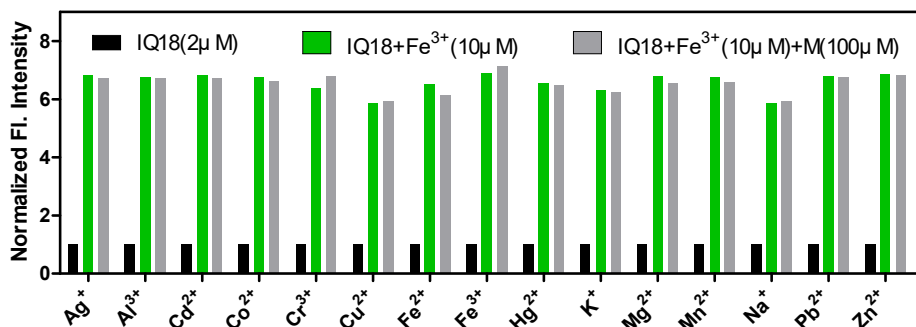


그림 11. Competitive studies of the **IQ18** ($2 \mu\text{M}$) in ethanol upon the addition of various metal ions. Green bars indicate the fluorescence response of **IQ18** to Fe^{3+} ($10 \mu\text{M}$). Grey bars represent the subsequent addition of different metal ions ($100 \mu\text{M}$) in the presence of Fe^{3+} ion, respectively; $\lambda_{\text{ex}} = 461 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 543 \text{ nm}$, slit width = $3 \text{ nm} / 5 \text{ nm}$

추가로 Fe^{3+} 와 다른 금속 이온들을 첨가하는 순서를 바꿔서 실험을 진행하였다(그림 12). 이는 다른 금속 이온들이 과량으로 존재하는 경우에도 **IQ18**이 Fe^{3+} 에 대해서 선택적으로 작용하여 결합을 형성하는지 확인하기 위한 실험이었다. 결과에서 보는 결과처럼, Cr^{3+} 를 제외한 나머지 금속 이온들을 첨가한 경우엔 형광의 증가가 거의 나타나지 않았다. 하지만 이어서 Fe^{3+} 을 첨가한 경우 모든 시료에서 균등한 값의 형광 세기가 나온 것을 관찰할 수 있었다. Cr^{3+} 는 Fe^{3+} 가 첨가되기 전부터 **IQ18**과 결합하여 형광의 증가가 나타났기 때문에, 1/10 밖에 안되는 Fe^{3+} 가 첨가되었을 변화가 거의 없었다. 400 nm에서 excitation 시킨

경우(그림 S10)에도 Cr^{3+} 를 제외하고 큰 감소가 나타나지 않았다. Cu^{2+} 와 Pb^{2+} 에서는 약간의 감소가 있었지만 이는 selectivity test (그림 10)에서 언급하였던 것과 같이 무시할 수 있는 정도였다. 이후에 Fe^{3+} 를 첨가하였을 때 형광이 크게 감소하는 결과가 나타났다. 이 결과로 유추할 수 있는 결과는 과량의 다른 금속 이온들이 존재하는 조건에서도 IQ18은 Fe^{3+} 에 대해서 선택적으로 강하게 결합한다는 것이다.

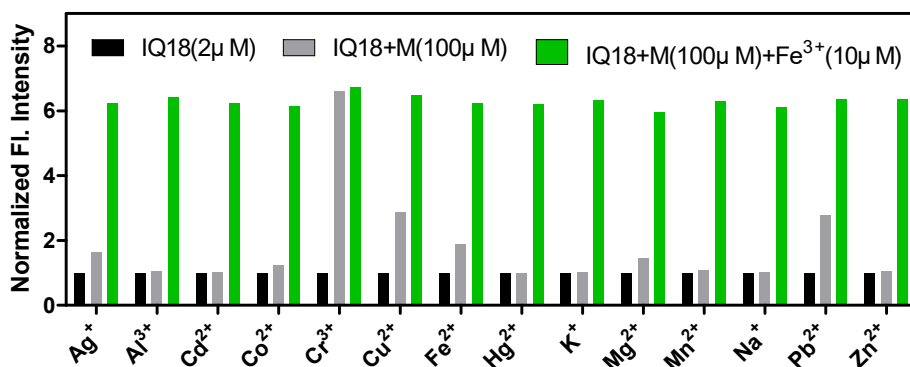


그림 12. Competitive studies of the IQ18 (2 μM) in ethanol upon the addition of various metal ions. Grey bars indicate the fluorescence response of IQ18 to different metal ions (100 μM). Green bars represent the addition of Fe^{3+} (10 μM) ions following the addition of other metal ions, respectively; $\lambda_{\text{ex}} = 461 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 543 \text{ nm}$, slit width = 3 nm / 5 nm

2.4 Binding property

2.4.1 Dissociation constant between IQ18 and Fe³⁺

IQ18과 Fe³⁺ 사이의 결합이 여러 금속 이온들이 존재하는 조건에서도 유지되고 형성될 수 있다는 것을 앞의 실험들을 통하여 알았다. 따라서 이 결합은 매우 강한 결합이라는 것을 알 수 있었고, 이 결합의 세기를 알아보하고자 dissociation constant (K_d)를 구할 수 있는 Benesi-Hildebrand plot 실험을 진행하였다(그림 13).⁴⁰⁻⁴³ Benesi-Hildebrand plot은 아래의 식을 사용하여 그린 plot이다. F_0 는 Fe³⁺를 넣지 않았을 때 IQ44의 형광 세기, F 는 Fe³⁺ 농도에 따른 486 nm에서의 형광 값이다.

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0 - F} + \frac{1}{K_a(F_0 - F)} \times \frac{1}{[\text{Fe}^{3+}]}$$

이 plot을 그릴 때 고려해야 할 점은 IQ18 대비 Fe³⁺이 과량으로 존재하는 조건에서 얻은 형광 값들을 이용해야 한다는 것이다. 따라서 IQ18 용액에 Fe³⁺를 titration 하면서 fluorescence spectrum을 측정하였지만(그림 S11), plot을 위해서는 2당량 이상의 Fe³⁺가 들어간 결과들만 사용하였다. 수식에 따라서 data를 처리하여 plot한 결과 K_d 값은 약 0.7 μM 이라는 계산값을 얻을 수 있었다. Benesi-Hildebrand plot에서 얻은 결과는 뚜렷한 linearity($R^2=0.9948$)를 관찰할 수 있는데, 이는 IQ18과 Fe³⁺ 사이의 결합이 1:1 비율로 이뤄진다는 것을 간접적으로 알려준다.

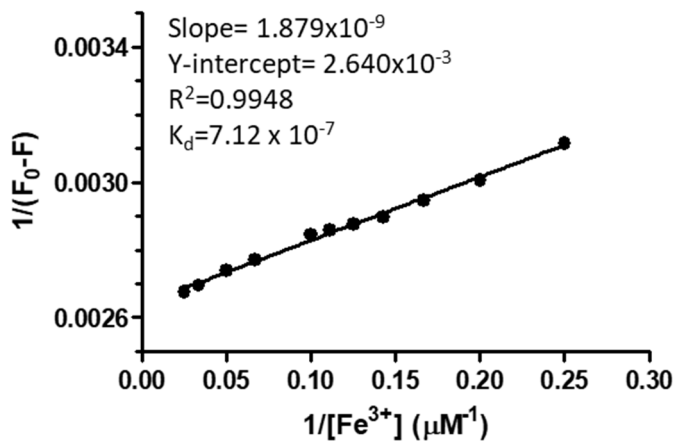


그림 13. Benesi-Hildebrand plot with IQ18 ($2 \mu M$) and Fe^{3+} ($4-40 \mu M$) in ethanol; $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 486 \text{ nm}$, slit width = $3 \text{ nm}/5 \text{ nm}$

2.4.2 Limit of detection of IQ18 for Fe^{3+}

IQ18과 Fe^{3+} 사이에 강한 결합을 형성한다는 것을 Benesi-Hildebrand plot을 통하여 구한 K_d 으로 확인하였다. 이어서 IQ18이 얼마나 민감하게 Fe^{3+} 에 반응하여 형광의 변화가 나타나는지 알아보기 위해서 검출한계(limit of detection, LOD)를 계산하였다. LOD는 ' $LOD=3\sigma/k$ ' 식을 이용하여 얻을 수 있었다.⁴⁴ 여기서 σ 는 Fe^{3+} 를 넣지 않은 상태에서 IQ18을 측정한 표준편차이고, k 값은 calibration curve의 기울기이다. 따라서 LOD를 계산하기에 앞서서 IQ18과 Fe^{3+} 사이의 calibration curve를 구하는 것이 우선이다. IQ18이 앞에서 언급한 것과 같이 ratiometric fluorescent sensor가 맞다면 형광의 감소와 증가가

나타나는 두 파장(486 nm, 543 nm)에서의 형광 값의 비를 y축으로 하는 calibration curve를 갖는다는 큰 특징이 있다.⁴⁵⁻⁴⁶ 따라서 I_{543}/I_{486} 을 y축, Fe^{3+} 농도를 x축으로 하는 plot을 구한 결과 linearity가 뚜렷하게 보이는 결과를 얻을 수 있었다(그림 14). 값을 통하여 LOD는 약 5.5 nM이라는 계산값을 구할 수 있었다. IQ18은 Fe^{3+} 이온에 대해서 nanomolar 단위의 LOD를 갖기 때문에 매우 민감한 ratiometric fluorescent sensor라고 말할 수 있다.

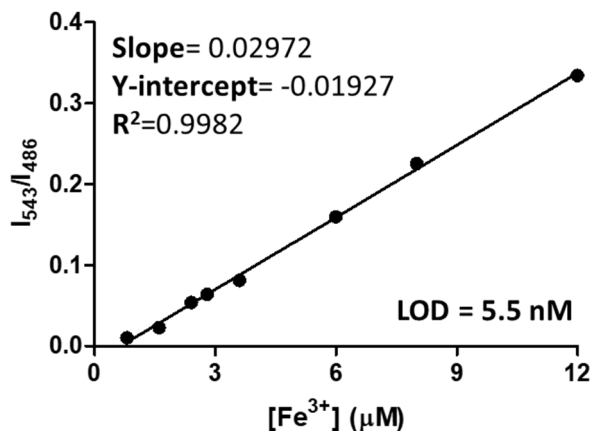


그림 14. The ratio of fluorescence intensity at 543 nm to at 486 nm versus equivalent of Fe^{3+} (range: 0.8–12 μM) in ethanol. Slit width = 3 nm / 5 nm

2.4.3 Stoichiometry between IQ18 and Fe³⁺

이어서 IQ18과 Fe³⁺이 어떻게 결합 하는지 알아보려고 하였다. 이러한 결합 모델을 알아보기에 앞서서 먼저 해야할 일은 IQ18과 Fe³⁺사이의 결합 비를 알아보는 것이었다. 두 물질 사이에 complex를 형성하는 경우 stoichiometry를 알기 위한 방법으로 Job's plot이 있다.⁴⁷⁻⁴⁸

Job's plot의 실험 방법은 IQ18과 Fe³⁺의 총 농도를 2 μ M로 맞추고 IQ18의 mole fraction을 0부터 1까지 0.1 단위로 바뀌가면서 형광을 측정한다. 이 때 fluorescence spectrum은 400 nm에서 excitation 시켜서 형광이 quenching 되는 모습을 살펴보았다(그림 S12). 그리고 Job's plot은 486 nm에서 측정된 형광 값을 이용하여 plot 진행하였다(그림 15).

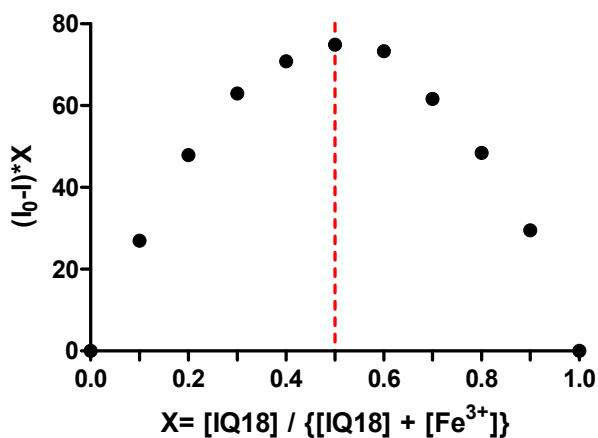


그림 15. Job plot of the Fe³⁺ – IQ18 complexes in an ethanol solution. The total concentration of IQ18 and Fe³⁺ was 2 μ M. The monitored wavelength was 486 nm; λ_{ex} = 400 nm, slit width = 3 nm/5 nm.

그 결과는 그림 15에서 알 수 있듯이 IQ18의 mole fraction이 0.5일 때 가장 높은 계산 값을 가졌다. 이는 IQ18과 Fe^{3+} 가 각각 0.5씩의 mole fraction을 가질 때, 가장 많은 수의 complex가 형성된다는 것을 의미한다. 만약 IQ18과 Fe^{3+} 사이의 결합 비율이 2:1 또는 1:2가 되기 위해서는 그래프에서 IQ18의 mole fraction이 0.66일 때와 0.33일 때 가장 높은 계산 값을 얻어야 한다.⁴⁹ 따라서 둘 사이의 결합 비율은 1:1이라는 결과를 job plot 실험을 통하여 알 수 있었다. 이는 앞서 Benesi-Hildebrand plot에서 보여준 linearity가 간접적인 1:1 결합을 보여주는 증거가 된다는 것과 함께 추가적으로 둘 사이의 stoichiometry를 보여주는 결정적인 결과이다.

2.5 Reversibility

IQ18과 Fe^{3+} 사이에 강한 결합이 형성되는 것을 알았다. 하지만 실제로 시료를 분석하는 경우 Fe^{3+} 와 비가역적인 결합을 형성한다면 IQ18을 계속해서 소비하고 합성해야한다는 단점이 있다. 따라서 본 실험에서 IQ18과 Fe^{3+} 사이에 형성되는 결합이 가역적인지 비가역적인지 알아보기 위해서 EDTA를 사용한 reversibility test를 진행하였다(그림 S13).⁵⁰⁻⁵¹ 먼저 IQ18 용액을 측정하고(case 1), 여기에 Fe^{3+} 를 넣은 뒤 측정한다(case 2). 그 결과 486 nm에서 형광의 감소가 나타났고, 여기에 넣어준 Fe^{3+} 와 같은 당량의 EDTA를 넣어주면(case 3) 형광이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 그렇지만 반복할수록 Fe^{3+} 에 의해 감소하는 정도는 조금씩 감소하였고, EDTA에 의해서 회복되는 형광 값도 서서히 감소하는 모습을 보였다. 이는 EDTA와 Fe^{3+} 간에 강한 chelation을 이루지만, 반복

할수록 그 chelation의 양도 많아지고 이로부터 해리되는 약간의 EDTA와 Fe^{3+} 가 점점 용액상에 많아지기 때문이라고 생각한다. 그럼에도 불구하고 과정을 반복하여도 IQ18은 계속 turn-off와 turn-on을 반복하는 모습을 보여주었다.(그림 16). 이러한 결과는 IQ18과 Fe^{3+} 사이의 결합은 강하지만 가역적이라는 것을 의미한다. 따라서 실제로 활용함에 있어서 EDTA로 다시 IQ18을 재생시켜 사용할 수 있다는 장점이 있다.

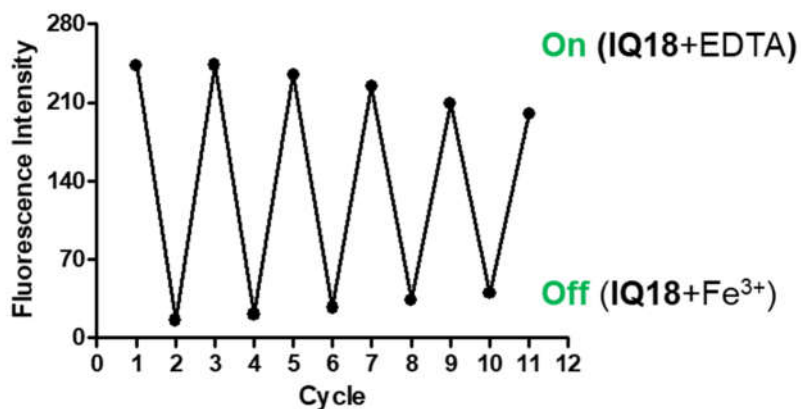


그림 16. Emission spectra showing the reversible complexation between IQ18 ($2 \mu\text{M}$) and Fe^{3+} ($20 \mu\text{M}$) in ethanol solution by introduction of $20 \mu\text{M}$ EDTA (100 mM in pH 8.0 PBS buffer solution); $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 486 \text{ nm}$, slit width = $3 \text{ nm}/5 \text{ nm}$

2.6 Binding mode

IQ18과 Fe^{3+} 사이에 1:1로 결합한다는 것을 알 수 있었고, 둘 사이의 결합 모델에 대하여 C-ring의 nitrogen(N)과 E-ring의 heterocycle에

존재하는 heteroatom이 electron donor로 작용하여 금속 이온과 complex를 형성할 것이라고 가설을 세웠다. 이러한 가설과 일치하는지 알아보기 위한 실험으로 먼저 NMR titration 실험을 진행하였다. Fe^{3+} 의 paramagnetic한 성질 때문에 NMR spectrum에서 peak들이 많이 broadening 해지지만, Fe^{3+} 와 결합하는 부분 근처의 proton들은 electron deficiency 되는 영향을 받기 때문에 downfield로 크게 이동하게 될 것이라고 예상하였기 때문이다.^{50, 52-53} 따라서 IQ18에 조금씩 Fe^{3+} 를 첨가하면서 NMR spectrum을 얻어보면 처음 Fe^{3+} 가 없을 때의 spectrum과 비교하였을 때 움직임이 있는 peak와 없는 peak이 나눌 수 있을 것이라고 생각하였다. 지금까지 ethanol에서 모든 실험을 진행하였기 때문에 ^1H NMR titration 실험도 이와 비슷한 조건인 methanol (CD_3OD)에서 실험을 진행하였다(그림 17).

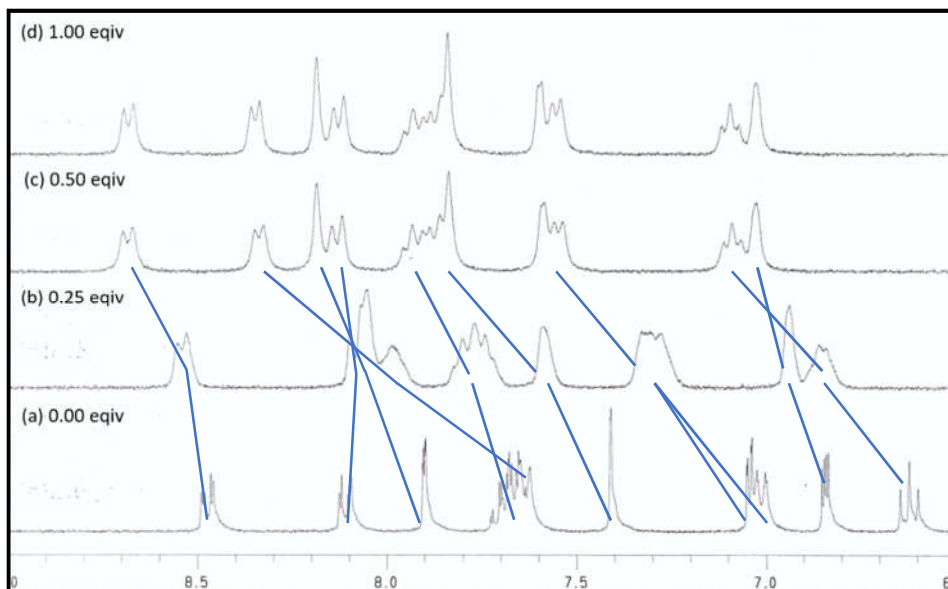


그림 17. ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) spectra of **IQ18** (7.83 mM) upon titration with (a) 0 eq., (b) 0.25 eq., (c) 0.5 eq., (d) 1.0 eq. of Fe^{3+} (117.5 mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in CD_3OD solution), expanded from 6.5 ppm to 9.0 ppm. Predicted movement of each peak is marked with blue line.

Peak의 모양과 각각의 integration을 토대로 peak이 움직이는 모습을 예상하여 파란선으로 표시하였을 때, Fe^{3+} 와 결합하는 부근의 proton peak만 downfield로 이동할 것이라는 예상과는 달리 6.5 ppm에서 9.0 ppm 사이의 모든 proton이 downfield로 이동하는 모습을 보였다. 이는 **IQ18**에서 methyl group에 있는 proton을 제외하고는 모든 proton이 resonance에 참여하는 탄소에 연결되어 있기 때문이라고 생각한다. ^1H

NMR titration 실험에서 정확한 결합 모델을 예측할 수 없었지만, 앞에서 수행한 job plot을 통해 얻은 1:1 결합 비와 다른 결과를 얻을 수 있었다. Fe^{3+} 0.5당량을 첨가한 NMR spectrum(그림 17c)과 1.0당량을 첨가한 spectrum(그림 17d) 사이에 proton peak의 움직임이 전혀 없는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 결과는 앞의 job plot에서 얻은 stoichiometry 결과와 달리 **IQ18**과 Fe^{3+} 사이의 결합 비율이 2:1 이라는 것을 의미한다.

모든 peak가 down field로 이동하였기 때문에 각각의 peak들에 대해서 확실한 assignment를 진행하기 위해서 **IQ18**과 **IQ18**에 Fe^{3+} 를 반응시켜서 얻은 **IQ18-Fe**를 $\text{DMSO}-d_6$ 에 녹여 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, NOESY spectrum을 얻어 assignment를 완료하였다. $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectrum은 바로 옆 탄소에 연결된 proton과의 signal을 보여주며, NOESY spectrum은 두 proton 사이의 거리가 5Å 이하로 가까운 경우에만 signal이 나타난다. 따라서 **IQ18**의 경우 downfield에서 singlet으로 나타나는 g proton(H_g)과 furan ring에서 나타나는 특징적인 pseudo-triplet⁵⁴ peak을 보여주는 j proton(H_j)을 기준으로 NOESY spectrum을 해석할 수 있었다(그림 S14). **IQ18-Fe**의 경우 A-ring에 존재하는 H_a 는 가장 downfield에 계속 위치하고 있으므로, 이 peak를 중심으로 COSY spectrum을 해석할 수 있었다(그림 S15). 그리고 Fe^{3+} 와 C-ring nitrogen이 결합하는 경우 이 부분에 electron deficiency 효과가 발생할 것이라고 생각하여 N-methylation을 진행하여 얻은 **IQ18-S**에 대해서도 $\text{DMSO}-d_6$ 에 녹여 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, NOESY spectrum을 얻었다. **IQ18**처럼 NOESY spectrum을 이용하였으며, downfield에서 singlet으로 뜨는 g proton(H_g)과 pseudo-triplet으로 보이는 j proton(H_j)을 중심으로 모두

해석할 수 있었다(그림 S16). 다음의 그림은 6.5 ppm 부터 9.0 ppm 까지의 범위에 있는 spectrum을 확대하여 모아놓은 것이다(그림 18). Spectrum에 있는 모든 peak은 IQ18의 proton에 맞춰서 알파벳으로 표시하였다.

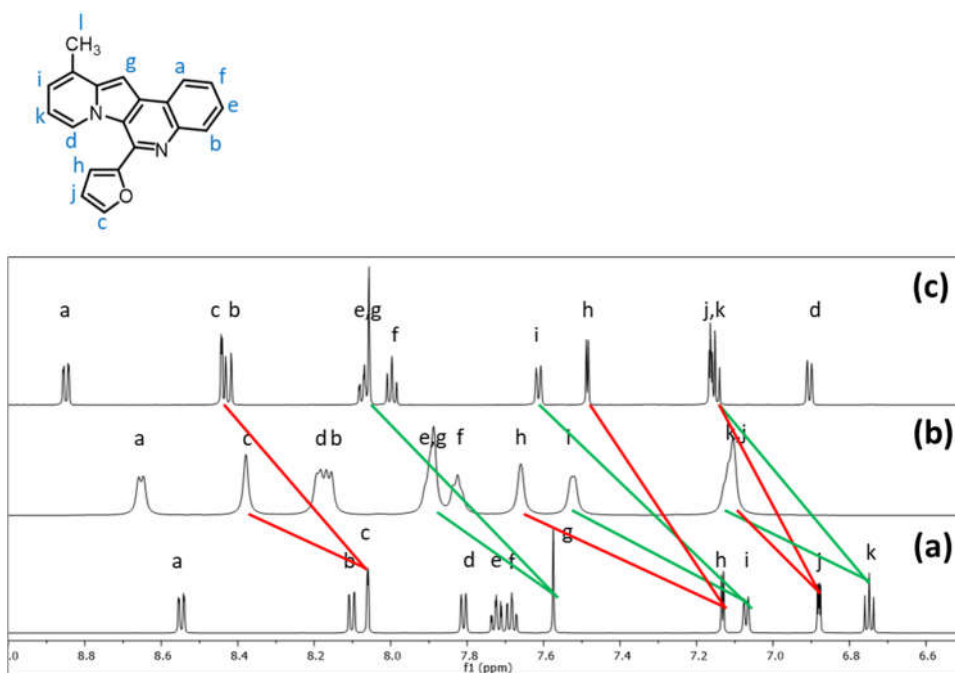


그림 18. ¹H NMR spectral analysis of IQ18 (a), IQ18-Fe (b), and IQ18-S (c) (600 MHz, DMSO-*d*₆). Signals indicating protons in furan ring and indolizine part (except H_d) were marked with red and green, respectively; IQ18-Fe is orange powder from the reaction between IQ18 and Fe(NO₃)₃•9H₂O (1 eq.) in ethanol.

IQ18-Fe와 IQ18-S에서 보면 대부분의 peak들이 IQ18에 비해서 downfield로 이동한 것을 알 수 있다. 가설에서 electron donor로 작용할 수 있는 heteroatom이 있는 furan의 proton은 빨간색으로 이동을 표시하였다. 또한 움직임이 가장 크게 보이는 indolizine moiety에 있는 proton들도 초록색으로 그 움직임을 표시하였다. Fe³⁺가 붙었음에도 불구하고 quinoline moiety의 proton peak이 indolizine moiety의 proton peak보다 크게 움직이지 않았다. 수치상으로 비교해봐도 downfield로 이동한 ppm의 차이가 indolizine의 proton이 quinoline의 proton보다 약 2~3배 높았다(표 S1). 앞서 언급한 것과 같이 quinoline의 nitrogen에 methylation을 진행함으로써 quinoline에 Fe³⁺ 결합했을 때와 같은 electron deficiency 효과를 제공했다고 볼 수 있다. 하지만, IQ18-S에서도 IQ18-Fe의 spectrum에서 볼 수 있는 것과 같은 움직임을 보여주었다. 이는 IQ18, IQ18-Fe, IQ18-S 세가지 spectrum을 비교한 위의 그림에서 초록색과 빨간색 표시된 선만 봐도 쉽게 알 수 있다. 예외적으로 A-ring에 존재하는 d proton의 경우 IQ18-Fe에서는 downfield로 이동하였지만, IQ18-S에서는 매우 크게 upfield로 이동한 것을 알 수 있다. 이러한 차이에 대한 이유를 생각해보면 IQ18-S의 경우 N-methylation 시켜서 nitrogen 부분에만 electron deficiency 효과를 제공한 것이지만 IQ18-Fe의 경우 가설에 따르면 nitrogen뿐만 아니라 furan의 oxygen 부분에도 electron deficiency 효과를 줄 것이다. 확실하진 않지만 이것이 두 spectrum에서 d proton의 움직임이 다른 이유일 수 있다.

앞의 결과를 정리하면 IQ18에 비해서 IQ18-Fe와 IQ18-S에서 d

proton을 제외한 indolizine part가 공통적으로 움직인 것으로 보아 C-ring의 nitrogen이 complex 형성에 참여한다는 것을 알 수 있다. **IQ18-Fe**에서 furan에 존재하는 proton의 peak 3개 모두 downfield로 크게 이동하였다. 이는 처음 NMR titration 실험을 진행할 때 세웠던 가설과 부합하는 부분이므로 furan의 oxygen이 참여한다고 예상할 수 있다.

더 나아가 binding model에 대해 세웠던 가설에 확실한 증거를 얻기 위해서 앞에서 얻었던 **IQ18**과 **IQ18-Fe** 두 가지 물질의 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum을 겹쳐서 비교해보았다(그림 19). 앞서 언급하였던 것과 같이 NOESY spectrum은 두 proton 사이의 거리가 5 Å 이하로 가까운 경우에만 signal을 보여준다. **IQ18**에서 E-ring은 solvent에서 자유롭게 rotation이 있지만, Fe^{3+} 와 complex를 형성하여서 E-ring의 rotation이 금지되고 furan의 배향이 고정된 경우 두 NOESY spectrum 사이에 차이가 있을 것이라고 예상하였다.

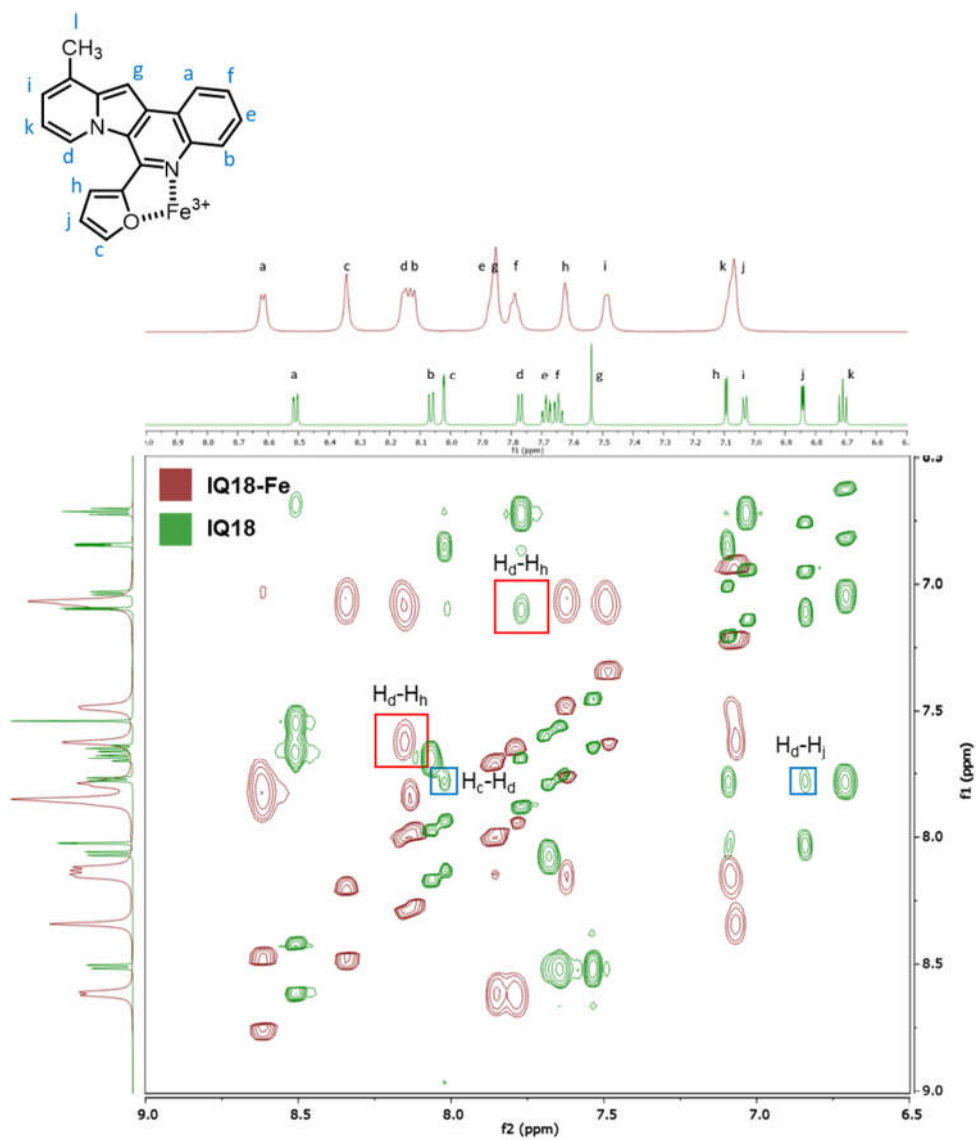
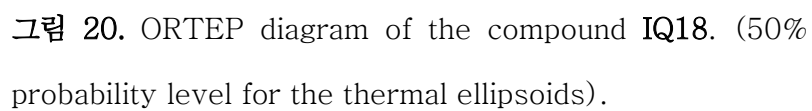


그림 19. ^1H NOESY NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectra of **IQ18** (green) and **IQ18-Fe** (brown). The resonance ($\text{H}_d\text{-H}_h$) that increases in presence of Fe^{3+} was highlighted with red box. And resonances that disappeared in presence of Fe^{3+} was highlighted with blue box.

IQ18과 IQ18-Fe의 ^1H - ^1H NOESY spectrum에 기존에 완료한 assign을 표시하였다. 앞에서 예측했던 내용을 확인하기 위해서 indolizine moiety에 존재하는 H_d 과 furan에 존재하는 3가지 proton (H_c , H_h , H_j) 사이에 나타나는 signal에 초점을 맞추었다. 위의 NOESY spectrum 결과에 d proton(H_d)과 h proton(H_h) 사이에 나타나는 signal(H_d - H_h)은 빨간색 박스로 표시하였으며, d proton(H_d)와 c proton(H_c) 또는 j proton(H_j) 사이에서 측정되는 signal(H_d - H_c , H_d - H_j)은 파란색 박스로 표시하였다. 먼저, IQ18의 NOESY spectrum을 분석해보면 H_d - H_h , H_d - H_c , H_d - H_j signal이 모두 표시된 것을 알 수 있다. 실제로 IQ18의 crystal을 사용하여 XRD 분석을 진행한 결과(그림 20), H_d - H_h , H_d - H_c , H_d - H_j 사이의 거리가 각각 3.51, 4.49, 4.22 Å으로 모두 5Å이하였다. 하지만 이와 다르게 IQ18-Fe의 NOESY spectrum의 경우 H_d - H_h signal은 증가되었지만, H_d - H_c , H_d - H_j signal은 아예 측정되지 않았다는 것을 알 수 있다. MestReNova 프로그램을 이용하여 contouring을 높이거나 낮춰보았을 때도 noise signal만 강해졌으며 H_d - H_c 또는 H_d - H_j 사이의 signal은 전혀 나타나지 않았다. 즉, IQ18에 Fe^{3+} 이 첨가되어 complex를 형성한 경우에 H_d - H_c , H_d - H_j signal이 사라졌으며 이는 d proton(H_d)과 c proton(H_c), j proton(H_j) 사이의 거리가 5Å이상인 되어 멀어졌다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 quinoline moiety의 nitrogen과 furan의 oxygen이 electron donor로 작용하여 Fe^{3+} 와 complex를 이루는 위에 제시한 IQ18과 Fe^{3+} complex 결합 모델이 적합하다는 것을 뒷받침해준다.



3. Turn-on fluorescent sensor, IQ44

3.1 Absorption and fluorescence spectra

IQ44 용액에 Fe^{3+} 를 첨가하면서 두 물질 사이의 상호작용에 따라 변화하는 IQ44의 UV-vis absorption spectrum과 fluorescence spectrum을 관찰하였다. 두 spectrum의 변화 모두 ethanol과 수용액에서 각각 진행하였다.

3.1.1 Spectra in ethanol

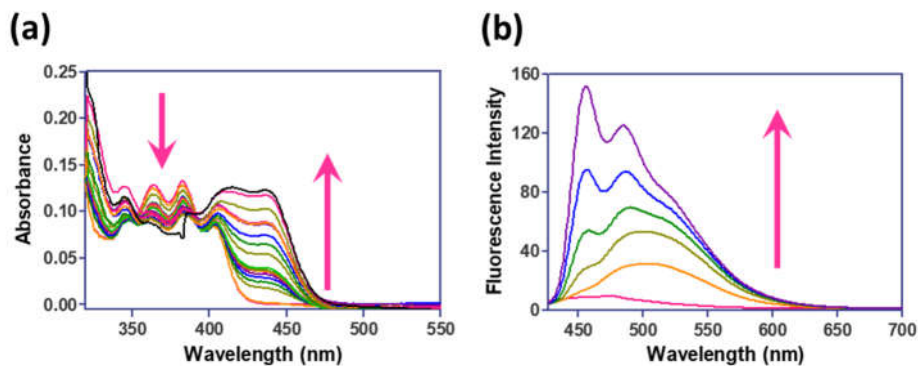


그림 21. Changes in the absorption spectra of IQ44 (10 μM) (a) and fluorescence emission spectra of IQ44 (2 μM) excited at 417 nm (b) in ethanol solutions with various amounts of Fe^{3+} (0–10 equiv.). Slit = 3 nm/5 nm

먼저 ethanol에서 Fe^{3+} 첨가에 따른 UV-vis spectrum을 측정하기 위해서 Fe^{3+} 를 0당량부터 1당량까지 0.1당량씩 추가로 넣어주면서 변화를 관찰하였고, 1당량 이후 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0당량에 맞게 적절히 Fe^{3+} 를 더 추가로 넣어주면서 spectrum 측정을

완료하였다(그림 21a). 이렇게 얻은 spectrum을 보면 375 nm 부근에서 absorbance 값이 Fe^{3+} 의 농도가 증가할수록 감소하는 것을 볼 수 있으며 반대로 약 400 nm 부터 470 nm 사이 구간의 absorbance 값은 높게 증가하는 것을 알 수 있다. 그렇지만 absorbance가 감소하는 정도는 IQ18에서 봤던 것처럼 큰 폭으로 감소하지는 않았다. 따라서 10당량의 Fe^{3+} 를 넣었을 때 absorbance 값이 가장 최고를 나타내는 417 nm를 excitation 파장으로 정하고 Fe^{3+} 을 넣어주면서 fluorescence spectrum을 측정하였다(그림 21b). Fluorescence spectrum의 측정은 UV-vis absorption spectrum을 얻을 때와는 달리 Fe^{3+} 를 0당량부터 10당량까지 4 μM 씩 증량시켜 그 경향성을 관찰하였다. 그 결과 453nm에서 가장 큰 peak, 483 nm에서 두번째로 큰 peak를 형성하며 형광이 증가하는 그림과 같은 spectrum을 얻을 수 있었다. 그러므로 ethanol에서 IQ44는 Fe^{3+} 에 대해서 turn-on fluorescent sensor로 작용한다고 볼 수 있다.

3.1.2 Spectra in H_2O

수용액에서도 ethanol에서와 같이 Fe^{3+} 첨가에 따른 spectrum의 모습을 살펴보기 위해서 Fe^{3+} 를 0, 2, 4, 6, 8, 10당량까지 2당량(20 μM)씩 증가시키며 UV-vis absorption spectrum을 측정하였다(그림 22a). 그 결과 370 nm에서 absorbance가 감소하고 430 nm에서 absorbance가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

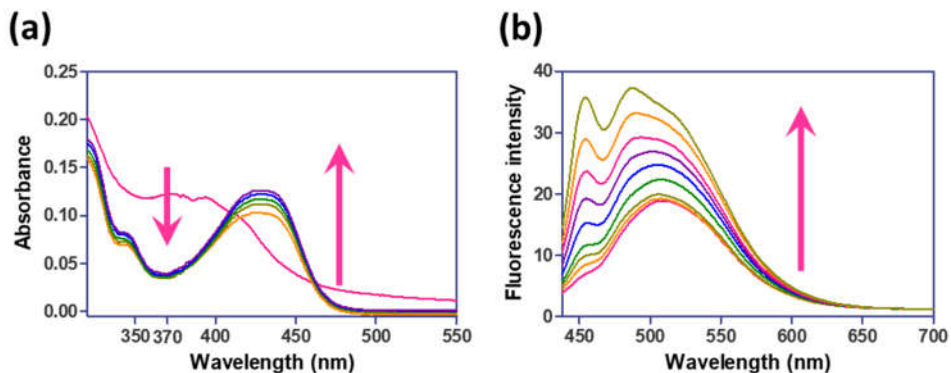


그림 22. Changes in the absorption spectra of IQ44 (10 μM) (a), fluorescence emission spectra of IQ44 (2 μM) excited at 417 nm (b) in DW solutions with various amounts of Fe³⁺ (0–10 equiv.); Slit width = 3 nm/5 nm

이어서 ethanol에서 했던 것과 같이 0.1당량씩 Fe³⁺을 증량시키며 titration 실험을 진행하였지만 370 nm에서 absorbance 감소는 잘 나타나는데 비해서 430 nm에서 absorbance의 증가는 잘 나타나지 않았다(그림 32). 그래서 2당량씩 Fe³⁺을 넣어주면서 UV-vis absorption spectrum 변화를 관찰하였다(그림 22a). UV-vis absorbance spectrum의 측정 이후 가장 높은 absorbance 값을 보여준 430 nm에서 excitation 시켜서 형광을 측정하였다(그림 22b). 이 때 Fe³⁺를 2당량씩 10당까지 넣어주면서 측정하였으며 결과는 453 nm와 483 nm에서 peak가 나타나는 fluorescence spectrum을 얻을 수 있었다. Ethanol에서와 다르게 370 nm 부근에서 absorbance 값이 큰 폭으로 감소하였기 때문에 IQ18과 같이 ratiometric fluorescent sensor로

작용하는지 알아보기 위해서 370 nm 파장에서 excitation 시켜 fluorescence spectrum을 관찰하였다(그림 S17). 형광의 감소가 나타나기 보다는 형광의 증가량도 작고 그 시간도 오래 걸리지만 430 nm에서 excitation 시켰을 때와 비슷하게 453 nm, 483 nm에서 형광이 높아지는 spectrum을 얻을 수 있었다. 그러므로 수용액에서도 IQ44는 ethanol에서와 같이 Fe^{3+} 에 대해서 turn-on fluorescent sensor로 활용할 수 있을 것이다.

3.1.3 Optimization of excitation wavelength

수용액에서 370 nm와 430 nm 두 종류의 파장에서 excitation 시켰을 때, 공통적으로 형광이 증가하였지만 그 증가량에는 차이가 있다는 사실을 관찰할 수 있었다. 따라서 3.1.2에서는 absorbance 값이 최고를 보여주는 파장에서 fluorescence spectrum을 측정하였지만 이번 실험에서는 각각의 solvent에서 absorbance의 증가량이 가장 큰 파장에서 excitation 시켜서 fluorescence spectrum을 측정하였다. Ethanol과 수용액 모두에서 440 nm 파장에서 absorbance의 증가량(또는 변화량)이 가장 컸기 때문에 excitation 파장을 400 nm로 정하고 ethanol과 수용액에서 Fe^{3+} 첨가에 따른 fluorescence spectrum의 변화를 살펴보았다(그림 23). 가장 높은 값의 absorbance를 나타낸 파장에서 얻은 것과 비슷한 경향성의 spectrum을 얻었다. 특히, 가장 높은 peak이 나타나는 450 nm와 그 다음 peak이 나타나는 483 nm는 기존에 453 nm와 483 nm에서 peak가 나타나는 결과와 거의 일치한다. 하지만 예상했던 것처럼

형광의 증가량에서 큰 차이를 보였으며, 440 nm에서 excitation 시켰을 때의 형광 값이 더 크게 나타났다. 따라서 이후 실험에서 특별한 언급이 없는 이상 solvent에 상관없이 형광 측정에는 440 nm를 excitation 파장으로 사용하였다.

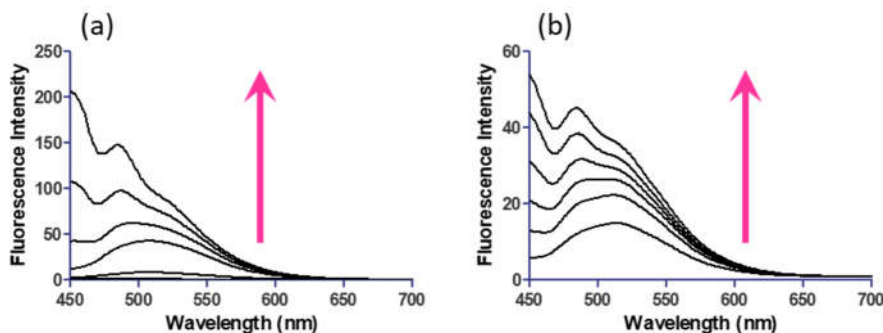


그림 23. Fluorescence emission spectra of IQ44 ($2 \mu\text{M}$) excited at 440 nm in ethanol (a), DW (b) solutions with various amounts of Fe^{3+} (0–10 equiv.); Slit width = 3 nm/5 nm, incubation time=30 s

3.1.4 Increment of fluorescence of IQ44 without Fe^{3+}

수용액에서 fluorescence spectrum을 측정하면서 함께 알게 된 사실은 IQ44가 Fe^{3+} 를 넣어주지 않아도 형광의 증가가 약하게 나타나며 spectrum의 모양도 변화한다는 것이다. 그렇지만 Ethanol에서는 Fe^{3+} 를 넣어주지 않으면 fluorescence spectrum 변화가 없었다. 따라서 수용액 조건에서 IQ44의 형광의 증가가 계속해서 나타나는지 살펴보기 위해서 $10 \mu\text{M}$ IQ44 수용액을 제조하고 30초 후부터 60분 동안 fluorescence spectrum을 측정하였다(그림 24). 그 결과 서서히 형광이 증가하다가

60분 정도 되었을 때 형광 값이 일정한 saturation 곡선을 나타냈다. 하지만 이런 증가는 Fe^{3+} 를 첨가하였을 때와 비교하면 무시 가능한 정도였다. 그리고 IQ18에서와 같이 incubation time을 30초로 맞추는 경우, 그 증가량은 더 작기 때문에 무시할 수 있다. 따라서 뒤의 실험들을 진행함에 있어서 일반적으로 언급이 없는 경우 IQ18에서와 같이 incubation time을 30초로 맞춰서 측정하였다.

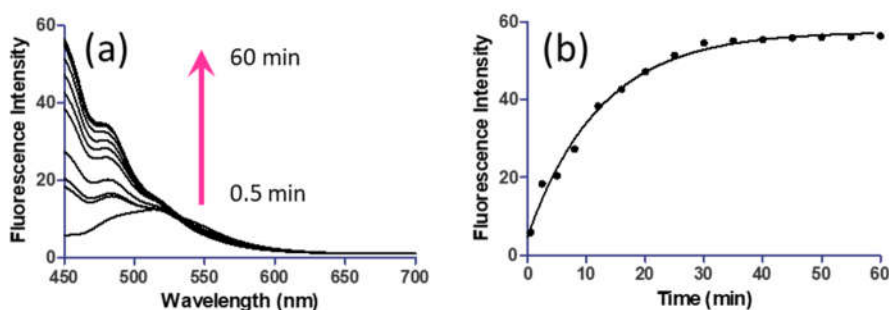


그림 24. Change of fluorescence spectrum of IQ44 ($2 \mu\text{M}$) (a) and the fluorescence intensity of IQ44 at 450 nm (b) for 60 min in DW; $\lambda_{\text{ex}}=440 \text{ nm}$, slit width = 3nm/5 nm

3.2 Selectivity test

먼저 IQ44가 Fe^{3+} 에 대해서만 선택적으로 작용하는지 알아보기 위해서 selectivity test를 진행하였다. IQ18에서 사용하였던 것과 같이 15가지 금속 이온들(Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+})을 사용하여 실험하였다. IQ44는 Fe^{3+} 를 넣은 이후 천천히 형광이 증가하기 때문에 넣은 후 incubation time을 30초 준 후와 60분 후에 fluorescence spectrum을 측정하였다. 형광이 천천히

증가하는 이유는 IQ44와 Fe^{3+} 사이의 결합이 천천히 형성되기 때문이라고 생각할 수 있다.

3.2.1 Selectivity test in ethanol

Ethanol에서 selectivity test를 진행한 결과(그림 25) 13개 금속 이온 (Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+})에 대해서는 형광의 증가가 없었다. IQ18에서 봤던 것과 같이 Cr^{3+} 에 대해서 cross-selectivity가 나타났으며 형광이 증가하였다. 이는 앞서 IQ18의 selectivity test에서 설명한 것과 같은 두 가지 이유 때문일 것이다. 하지만 IQ18에서는 두 이온을 넣은 경우 모두에서 형광이 거의 없었다. 따라서 Cr^{3+} 와 Fe^{3+} 중에서 어떤 금속이 더 크게 영향을 미치는가 알 수 없었다. 그렇지만 IQ44는 Fe^{3+} 와 결합 형성이 느리기 때문에 60분이 지난 후 측정한 값이 더 유의(有意)하다고 말할 수 있다. 이 때의 데이터를 살펴보면, Cr^{3+} 를 넣었을 때 형광이 약 200배 증가하였으며 Fe^{3+} 를 넣었을 때는 약 274배 증가하였다. 따라서 IQ44가 Fe^{3+} 에 대하여 selectivity가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 이온을 구분할 수 있다는 점은 Fe^{3+} 에 선택적인 fluorescent sensor로써는 큰 장점이라고 볼 수 있다.

앞서 excitation 파장을 440 nm로 맞춰서 측정 하였지만, 이는 Fe^{3+} 를 넣었을 때 형광의 증가량이 가장 크기 때문이었다. 하지만 다른 파장에서 excitation 시킬 경우, Cr^{3+} 와 Fe^{3+} 사이에 다른 결과가 나타날 수 있을 것이라 예상하였다. 따라서 absorbance 값이 컸던 417 nm에서 selectivity test를 진행하였다(그림 S18). 그 결과 selectivity

경향성에는 큰 차이가 없었으며, 형광의 excitation 파장이 다르기 때문에 형광의 증가량에 차이가 있었다.

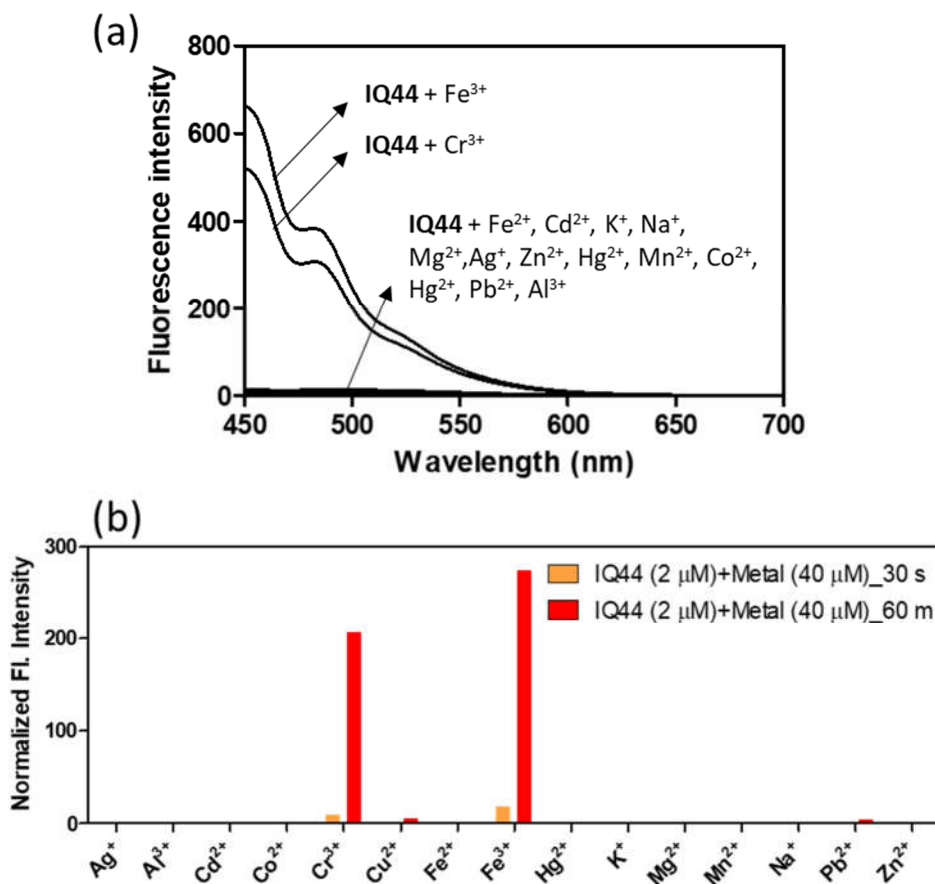


그림 25. Fluorescence response of chemosensor IQ44 (2 μM) in the presence of Fe³⁺ and other metal ions (40 μM) in ethanol solutions after 60 min (a) and the normalized fluorescence intensity at 450 nm after 30 sec and 60 min (b). λ_{ex} = 440 nm, Slit width = 3 nm/5 nm

3.2.2 Selectivity test in H₂O

수용액에서도 실험을 진행하였으며 selectivity test를 진행하여 얻은 결과(그림 26), ethanol에서 진행한 것과 비슷하였다. 수용액에서 형광의 증가량이 ethanol에서 형광의 증가량보다 적기 때문에 다른 금속 이온들을 넣었을 때의 결과가 ethanol에서 봤던 것보다 높게 나타났다. 하지만 Cr³⁺를 제외하면 IQ44는 수용액에서도 Fe³⁺에 높은 선택성을 보여준다. 나머지 13가지 금속 이온들(Ag⁺, Al³⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Pb²⁺, Zn²⁺)의 경우에도 60분 때 형광 세기가 30초일 때보다 높은 이유는, 그림 24에서 언급했던 것과 같이 IQ44는 수용액 상에서 Fe³⁺가 없이도 형광이 조금씩 증가하는 특징을 갖기 때문이다. Cr³⁺와 Fe³⁺에서 증가한 형광 세기에 비하면 무시할 수 있기 때문에 IQ44는 ethanol뿐만 아니라 수용액에서도 Fe³⁺에 선택적인 turn-on fluorescent sensor로 작용할 수 있다고 말할 수 있다. 더 자세히 보면 30초 일 때, Cr³⁺와 Fe³⁺에서 normalized 형광 값(≒2.9)과 다른 금속 이온에서의 normalized 형광 값(≒1.3) 사이의 비는 약 2.2정도지만 60분 일 때 그 값은 약 3.6(≒9.0/2.5) 정도로 증가하였다. 따라서 시간이 지날수록 selectivity도 증가한다는 것을 알 수 있다.

추가로 absorbance값이 가장 컸던 430 nm에서 excitation 시켜서 selectivity에 차이가 있는지 확인하였다(그림 S19). Cr³⁺와 Fe³⁺ 사이의 selectivity가 차이가 나타나는 것으로 보였지만 형광의 증가량이 너무 작았다. 그러므로 Cr³⁺ 외에 무시할 수 있었던 다른 13가지 금속 이온에 대한 기본적인 IQ44의 기본 형광값이 상대적으로 크게 나타났다. 결과적으

로 형광의 증가량과 selectivity를 고려하였을 때 440 nm를 excitation 파장으로 정하는 것은 합리적이라고 볼 수 있다.

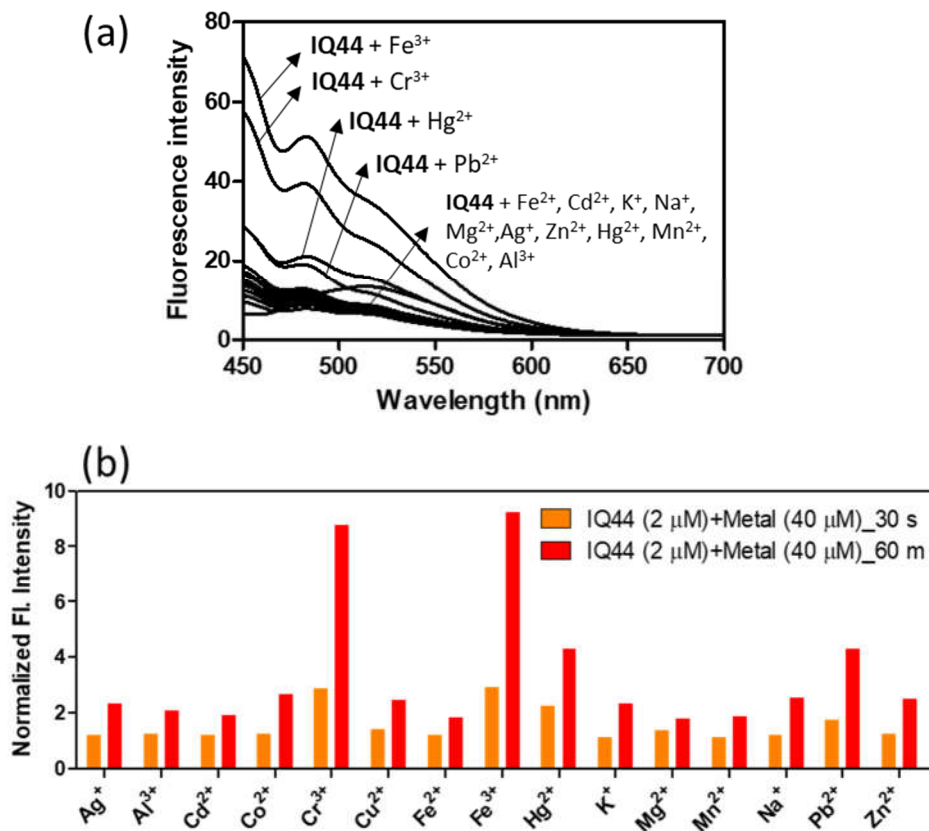


그림 26. Fluorescence response of chemosensor IQ44 (2 μM) in the presence of Fe^{3+} and other metal ions (40 μM) in DW solutions after 60 min (a) and the normalized fluorescence intensity at 450 nm after 30 sec and 60 min (b). $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, Slit width = 3 nm/5 nm

3.3 Competition test

다른 금속 이온들이 과량으로 존재하는 조건에서도 IQ44와 Fe^{3+} 가 결합하여 형광의 증가가 나타나는지 알아보기 위해서 competition test를 진행하였다. IQ44의 형광을 측정할 때는 incubation time을 30초, Fe^{3+} 를 넣은 후엔 결합이 천천히 형성되기 때문에 형광의 증가 역시 느리게 나타나므로 incubation time을 60분으로 설정하였다. 이어서 다른 금속 이온을 넣은 뒤에도 incubation time을 60분으로 동일하게 맞춰주었다. IQ44의 competition test도 Fe^{3+} 와 다른 금속 이온들을 넣는 순서를 다르게 하면서 시도해보았다(그림 S20). 그렇지만 Fe^{3+} 를 먼저 넣는 경우, 천천히 나타나는 형광의 증가가 다른 금속 이온을 넣은 뒤에도 영향을 준다는 단점이 있다. 따라서 selectivity test에서 다른 금속 이온들에 의한 형광의 증가가 거의 없는 것을 확인하였으므로 IQ44의 competition test는 다른 금속을 먼저 넣고, 그 뒤에 Fe^{3+} 를 넣는 방법으로 진행하였다.

3.3.1 Competition test in ethanol

먼저 ethanol에서 competition test를 진행한 결과(그림 27)를 보면 Cr^{3+} 을 제외한 다른 금속 이온들을 각각 $100\ \mu\text{M}$ 넣은 뒤 60분이 지난 상태에서도 회색의 bar가 보이지 않을 정도로 형광의 증가가 전혀 없었다. 그 상태에서 Fe^{3+} 를 다른 금속 이온의 1/10밖에 되지 않는 $10\ \mu\text{M}$ 만 넣고 60분 뒤 측정하였다. 처음 IQ44의 단독 형광보다 최소 약 85배에서 많게는 약 200배까지 증가하였다. Fe^{2+} 에서 가장 작은 증가 (약 85배)가 있었고, Pb^{2+} 에서 가장 큰 증가 (약 210배)가 나타났다. 각각의 금속 이

온들의 경우에 따라서 형광이 증가한 정도가 다른 이유는 Fe^{3+} 을 제외한 다른 금속들과 IQ44간의 친화도 차이 때문이라고 생각한다. 즉, IQ44와 친화도가 낮은 금속의 경우 Fe^{3+} 보다 과량이 존재하여도 IQ44와 Fe^{3+} 가 빠르게 결합하여 60분 후 더 큰 증가가 나타났을 것이라는 생각이다. 결과적으로 IQ44는 ethanol에서 Fe^{3+} 외의 다른 금속 이온들이 과량 존재하는 조건에서도 Fe^{3+} 와 결합을 형성하여 turn-on fluorescent sensor로 활용할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

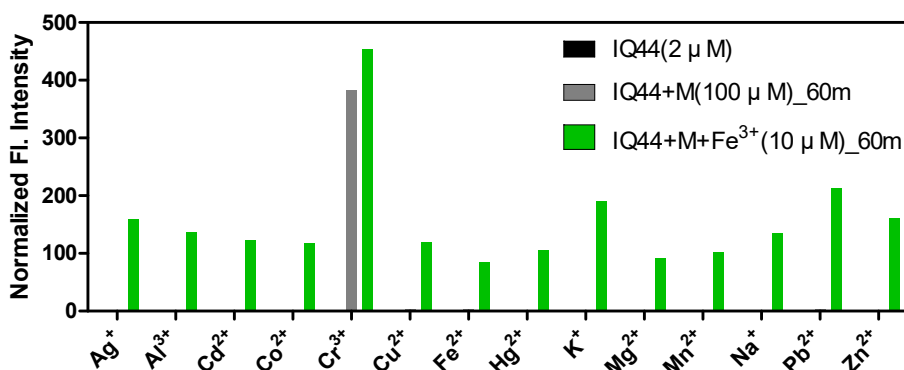


그림 27. Competitive studies of the IQ44 (2 μM) in ethanol upon the addition of various metal ions. Grey bars indicate the fluorescence response of IQ44 to various metal ions (100 μM). Green bars represent the addition of Fe^{3+} (10 μM) in the presence of other cations, respectively; $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$. Slit width = 3 nm / 5 nm

3.3.2 Competition test in H₂O

수용액에서도 ethanol에서와 같은 방법으로 실험을 진행하였다(그림 28). 결과를 보면 Cr³⁺ 외에도 Hg²⁺에 대해서도 60분 뒤 측정하였을 때 조금 형광의 증가가 보였다. 앞의 selectivity test에서는 Hg²⁺에서 형광의 증가가 보이지 않았던 것과 차이가 있는 이유는 selectivity test에서는 40 μ M, competition test에서는 100 μ M Hg²⁺를 사용하였기 때문이라고 생각한다. 이어서 Fe³⁺를 10 μ M 첨가하였는데도 불구하고 ethanol에서와 달리 형광의 증가가 크게 나타나지 않았다. 즉, IQ44는 수용액에서 과량의 다른 금속 이온들이 존재할 경우 Fe³⁺와 결합하여 turn-on fluorescent sensor로 사용하기 어렵다는 것을 의미한다.

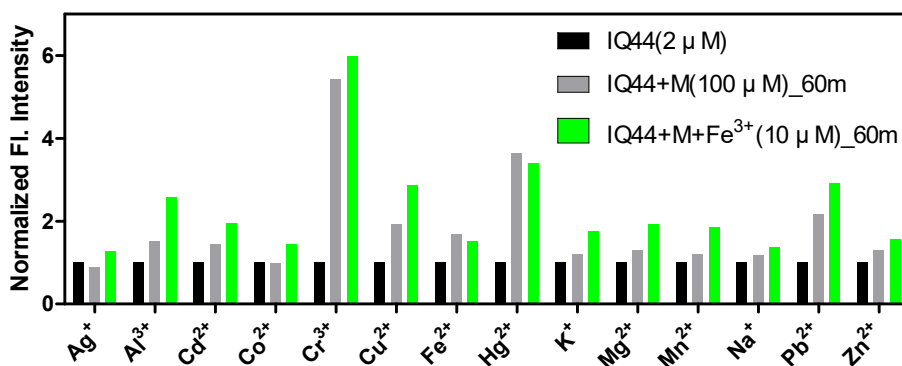


그림 28. Competitive studies of the IQ44 (2 μ M) H₂O upon the addition of various metal ions. Grey bars indicate the fluorescence response of IQ44 to various metal ions (100 μ M). Green bars represent the addition of Fe³⁺ (10 μ M) in the presence of other cations, respectively; λ_{ex} = 440 nm, λ_{em} = 450 nm. Slit width = 3 nm / 5 nm

3.4 Binding property

3.4.1 Dissociation constant between IQ44 and Fe^{3+}

Ethanol과 수용액에서 실행한 competition test의 결과가 차이가 나는 이유는 각각의 solvent에서 두 물질 사이의 결합력이 다르기 때문이라고 예상하였다. 따라서 두 가지 solvent에서 dissociation constant (K_d) 값을 구하고 비교하였다.

IQ44는 Fe^{3+} 와 만나서 느린 형광의 증가를 보여준다. 앞에서 썼던 Benesi-Hildebrand plot⁴⁰⁻⁴³의 경우 Fe^{3+} 의 농도와 이 때 형광 값 data를 사용하여 plotting 하는 방법이다. 따라서 saturation 된 상태의 형광 값이 아니라, 형광 수치가 증가하는 부분에서 얻은 값을 사용한다면 이 값은 짧은 순간에도 크게 변하기 때문에 결과를 신뢰할 수 없다. 따라서 **IQ44**의 K_d 값을 구하기 위해서 saturation 상태일 때의 형광을 측정하여서 Benesi-Hildebrand plot을 사용하는 방법과 relaxation method⁵⁵⁻⁵⁷를 이용하는 방법 두 가지를 모두 사용하였다. Relaxation method 방법은 각각의 Fe^{3+} 농도에 대해서 saturation이 보이거나 curved-fitting(one-phase decay)을 할 수 있을 때까지 timelapse 측정을 한다. 그 후 curved-fitting을 통하여 실험적으로 관찰된 속도상수(k_{obs})를 얻고 k_{obs} 와 Fe^{3+} 농도를 각각 y축과 x축으로 가지는 plot을 그린다. 그 결과 linear fitting하여 그려지는 추세선의 함수 식을 얻을 수 있는데 이 때의 y절편 값을 기울기로 나누면 dissociation constant (K_d) 값을 얻을 수 있다. 두 방법 모두 적용하기 위해서는 **IQ44**에 Fe^{3+} 를 넣은 후 timelapse 측정을 해야했다. 따라서 saturation이 나타날 때까지 ethanol에서는 120분(그림 S21a), 수용액에서는

60분(그림 S21b) 동안 측정하였다. 그 후 ethanol에서의 K_d 값은 relaxation method를 통하여 계산할 수 있었으며, 수용액에서 K_d 값은 Benesi-Hildebrand plot을 통해 얻을 수 있었다. Solvent마다 다른 방법을 사용한 이유는 각각의 결과에서 언급하였다.

3.4.1.1 Dissociation constant in ethanol

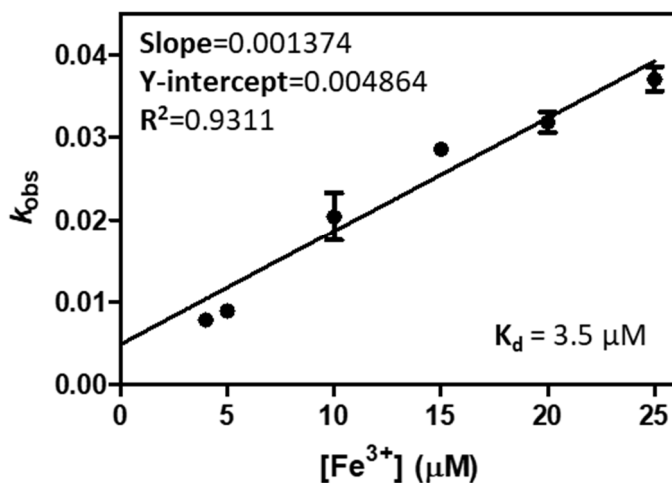


그림 29. Plot of the k_{obs} constant obtained by non-linear fitting of the binding curves against the corresponding concentrations of the Fe^{3+} in ethanol. IQ44 = 2 μ M, λ_{ex} = 440 nm, λ_{em} = 450 nm, slit width = 3 nm/5 nm

Ethanol에서는 relaxation method를 사용하여 K_d 값을 계산하였다(그림 29). 그 이유는 120분이 넘을 때까지 측정하였는데도 불구하고 낮은 농도의 Fe^{3+} (2.0~4.0 μM)에서 saturation curve를 얻을 수 없었기 때문에 Benesi-Hildebrand plot을 적용할 수 없었다(그림 S21a). Timelapse 측정한 결과를 바탕으로 curved-fitting (one-phase decay)을 할 수 있으면 relaxation method를 사용할 수 있으므로 이 방법을 통해서 얻은 IQ44와 Fe^{3+} 사이의 K_d 값은 약 3.5 μM 이었다.

3.4.1.2 Dissociation constant in H_2O

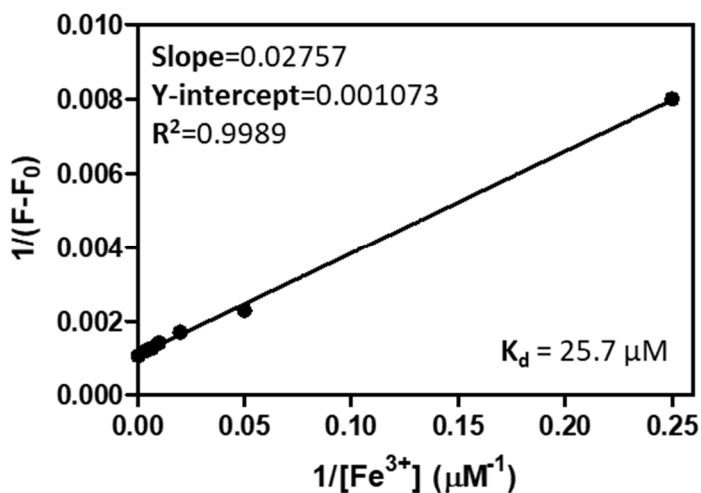


그림 30. Benesi-Hildebrand plot with IQ44 and Fe^{3+} in DW after 60 minutes of incubation. IQ44 = 2 μM , λ_{ex} = 440 nm, λ_{em} = 450 nm, slit width = 3 nm/5 nm

수용액에서는 ethanol에서와 다르게 Benesi-Hildebrand plot을 사용하였다(그림 30). 수용액에서는 IQ44의 형광이 Fe^{3+} 없이도 증가한다는 요인이 있기 때문에 Fe^{3+} 농도에 따른 형광의 증가 속도 차이를 이용하는 relaxation method는 적합하지 않다. Fe^{3+} 외에 다른 요인이 형광이 증가하는데 기여한다고 볼 수 있기 때문이다. 실제로 Benesi-Hildebrand plot에 사용하기 위해 timelapse 측정하여 얻은 data를 이용하여 relaxation method를 적용해보았지만 ethanol에서 얻어진 것과 같은 linearity를 보이지 않았다(그림 S22). IQ18에서와 같이 Benesi-Hildebrand plot을 통해 계산한 K_d 값은 $25.7 \mu\text{M}$ 이었다.

두 조건에서 계산하여 얻은 K_d 값을 비교해보면 ethanol에서 두 물질 사이의 결합이 수용액에서보다 약 7배 강하다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 앞서 competition test에서 ethanol에서는 다른 금속 이온들이 과량 존재하에서도 Fe^{3+} 가 들어간 이후 형광이 증가하지만 수용액에서는 증가하지 않는 현상을 설명해준다. Competition test에서 사용한 $10 \mu\text{M}$ Fe^{3+} 농도는 ethanol에서 얻은 K_d 값보다 약 2.8배 이상 높은 값이므로 IQ44의 대부분이 Fe^{3+} 와 결합할 수 있었을 것이다. 그렇지만 수용액에서는 $10 \mu\text{M}$ 이라는 값이 K_d 에도 못 미치는 값이므로 IQ44의 절반도 Fe^{3+} 와의 결합에 참여하지 않았을 것이라고 예측할 수 있다. 따라서 competition test에서 Fe^{3+} 가 다른 금속 이온들과 동량으로 존재하거나 $10 \mu\text{M}$ 보다 더 많이 있다면 뚜렷한 형광의 증가를 보여줄 수 있을 것이라고 예상할 수 있다.

3.4.2 Limit of detection of IQ44 for Fe^{3+}

이어서 **IQ44**가 얼마나 민감하게 Fe^{3+} 를 sensing할 수 있는지 알아보기 위해 검출한계(limit of detection, LOD)를 구해보았다. **IQ18**에서 했던 것과 같이 calibration curve를 얻고 ' $\text{LOD}=3\sigma/k$ ' 식을 이용하여 구하였다. 그렇지만 ethanol에서는 낮은 농도의 Fe^{3+} 에서 saturation 되어있는 형광 값을 얻을 수 없기 때문에 calibration curve를 그릴 수 없었다. 따라서 ethanol에서의 검출한계(LOD)는 계산할 수 없었다. 하지만 수용액에서는 앞의 K_d 값을 구하는 실험에서 이미 평형에 놓인 형광 값을 얻었기 때문에 calibration curve를 얻을 수 있었다(그림 31).

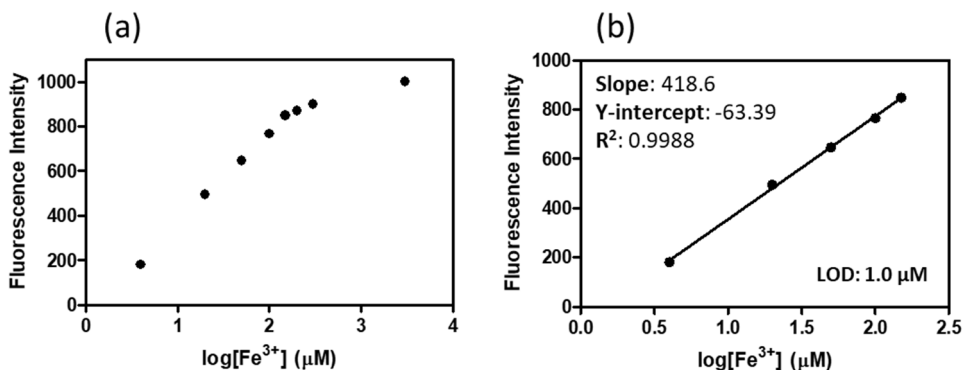


그림 31. (a) Calibration curve of **IQ44** (2 μM) in DW. (b) The expansion of calibration curve ([Fe³⁺]: 4–150 μM). Fluorescence intensity at 450 nm after 60 minutes of incubation.

수용액에서 얻은 calibration curve를 이용하여 ' $3\sigma/k$ ' 값이 약 8.7×10^{-4} 라고 구할 수 있었다, 그렇지만 이 값이 LOD라고 볼 수 없다. 그 이유는 사용한 calibration curve가 IQ18에서 얻었던 것과 다르게 x축이 $\log([\text{Fe}^{3+}])$ 이기 때문이다. 따라서 ' $3\sigma/k$ ' 결과는 $\log(\mu\text{M})$ 단위를 가지므로 $10^{(3\sigma/k)}$ 까지 계산하여야 원하는 검출한계(LOD) 값을 얻을 수 있다. 이렇게 계산하여 얻은 LOD는 약 $1.0 \mu\text{M}$ 의 값을 갖는 것으로 나타났다. Ethanol에서 IQ18의 Fe^{3+} 에 대한 LOD가 5.5 nM 였던 것에 비하면 약 180배 높으므로 IQ44는 수용액에서 Fe^{3+} 에 매우 민감하다고 말하기는 힘들다. IQ44의 ethanol에서 LOD는 구할 수 없었지만 앞의 competition test와 K_d 결과를 비교해 봤을 때 수용액에서보다는 낮은 값을 가질 것이라고 예상할 수 있다.

3.4.3 Stoichiometry between IQ44 and Fe^{3+}

마지막으로 IQ18과 Fe^{3+} 간의 결합 모델을 제시한 것과 같이 실험을 통하여 IQ44와 Fe^{3+} 결합 모델을 제시하고자 하였다. 먼저 Job's plot을 통하여 stoichiometry를 구하고자 하였으나 IQ44의 경우 시간이 오래 걸린다는 단점이 있기 때문에 Fe^{3+} titration 하면서 UV-vis absorption spectrum을 측정하는 방법으로 대신하였다(그림 32).⁵⁸

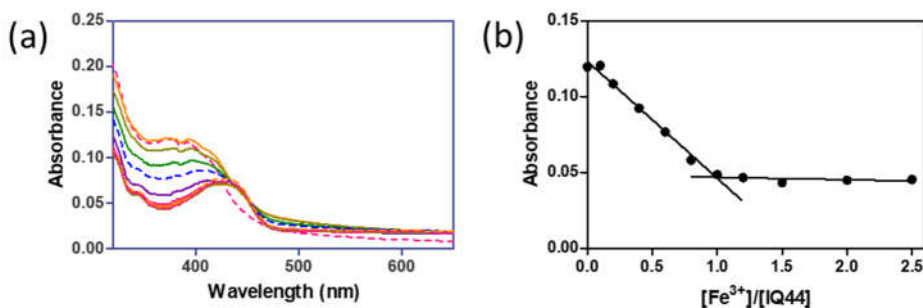


그림 32. Changes in the absorption spectra of IQ44 (10 μM) (a) and the absorbance at 370 nm (b) in DW solutions with various amounts of Fe^{3+} (0–25 μM).

수용액에서 IQ44의 UV-vis absorbance spectrum을 앞에서 측정하였을 때 2당량씩 첨가한 것과 달리 조금씩 첨가한 경우 370 nm에서 absorbance의 감소는 뚜렷하게 나타나지만, 430 nm에서 absorbance의 증가는 잘 나타나지 않았다. 그래서 Fe^{3+} 농도에 따른 370 nm에서 감소하는 absorbance 값을 이용하여 plot하였다. 그 결과 총 1당량의 Fe^{3+} 이 들어간 이후 absorbance 값이 거의 변화 없이 일정하게 유지되었다. 이러한 결과는 수용액에서 얻은 Benesi-Hildebrand plot의 linearity($R^2=0.9989$)가 의미하는 것과 함께 IQ44와 Fe^{3+} 는 1:1의 결합 비율을 가지며 서로 결합한다는 것을 보여준다.

3.5 Binding mode

3.5.1 Proposed binding model based on NMR spectra

다음으로는 IQ18에서 했던 ^1H NMR titration 실험^{50, 52-53}을 IQ44으로 바뀌서 수행하였다. IQ44는 Fe^{3+} 를 넣었을 때 형광의 증가가 느리게 나타났기 때문에, 둘 사이의 결합이 느리게 형성되는 것이라고 생각하였다. 따라서 IQ18에서 수행하였던 것처럼 IQ18 NMR 시료에 Fe^{3+} stock을 조금씩 첨가하여 바로 NMR spectrum을 측정하기에는 무리가 있다고 판단하여 Fe^{3+} 농도마다 NMR 시료를 각각 만들어 사용하였다. ^1H NMR titration 실험은 ethanol과 가장 비슷한 환경이라고 생각되는 methanol

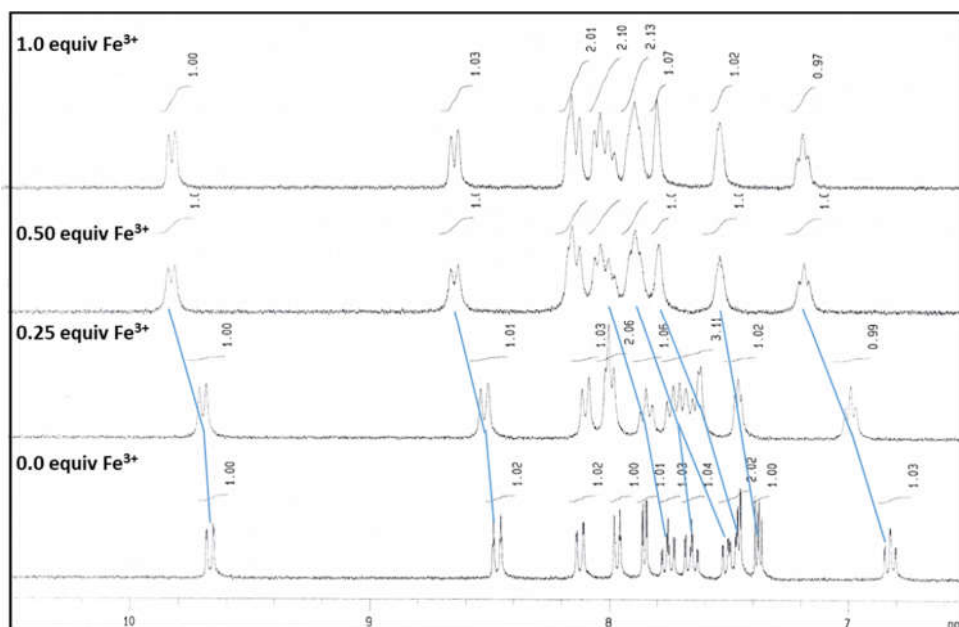


그림 33. ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) spectra of IQ44 (4.9–5.2 mM) upon addition of (a) 0 eq., (b) 0.25 eq., (c) 0.5 eq., (d) 1.0 eq. of Fe^{3+} (500 mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in CD_3OD solution), expanded from 6.5 ppm to 10.5 ppm.

(CD₃OD)에서 진행하였다(그림 33).

그림 33에서 보이는 것처럼 6.5 ppm–10.5 ppm 사이에 존재하는 모든 peak이 downfield로 이동하였다. 따라서 이를 통하여 결합 모델을 제시하기엔 어려움이 있었지만 peak의 모양을 바탕으로 각 peak의 이동을 예측하여 파란선으로 spectrum에 표시하였다. 추가로 앞서 **IQ18**의 결과에서 봤던 것처럼 0.5당량의 Fe³⁺를 넣어준 이후 proton peak의 이동은 전혀 없었다. **IQ44**도 Fe³⁺에 대한 fluorescent sensor로 작용하는 micro molar 농도에서는 1:1 비율로 결합하지만, milli molar 범위에서는 **IQ44**와 Fe³⁺가 2:1로 결합한다는 것을 알 수 있었다. ¹H NMR titration 실험을 통하여 얻은 결과를 assign하기 위해서 **IQ44-Fe**를 합성하고 **IQ44**와 함께 DMSO-*d*₆에 녹여 ¹H-¹H COSY NMR spectrum과 ¹H NMR spectrum(그림 34)을 얻었다. 추가로 **IQ44**는 ¹H-¹H NOESY NMR spectrum까지 얻을 수 있었지만 **IQ44-Fe**의 경우 **IQ18-Fe**와 다르게 NOESY spectrum을 얻을 수 없었다. **IQ44**의 ¹H NMR spectrum의 모든 proton peak는 NOESY NMR spectrum(그림 S23)을 이용하였으며, **IQ44-Fe**는 COSY NMR spectrum을 통해서 assign을 완료할 수 있었다(그림 S24). 이렇게 얻어진 **IQ44**와 **IQ44-Fe**의 ¹H NMR spectrum을 비교해보았다(그림 34). 각각의 peak는 **IQ44**에서 assign 완료한 것을 기준으로 하여서 spectrum에 알파벳으로 표시하였다.

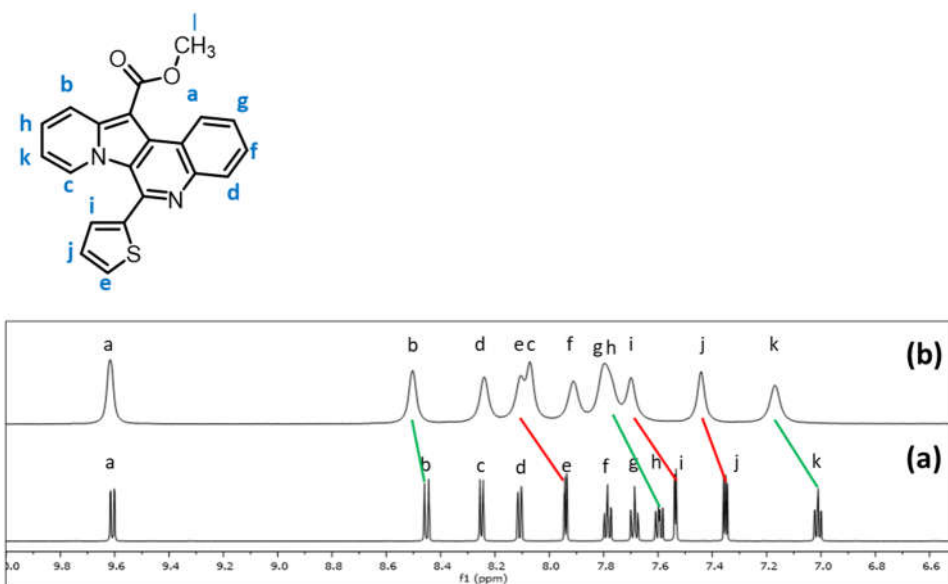


그림 34. ^1H NMR spectral analysis of **IQ44** (a) and **IQ44-Fe** (b) (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$). Signals indicating protons in furan ring and indolizine part (except H_c) were marked with red and green, respectively. **IQ44-Fe** is orange powder from the reaction between **IQ44** and $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (10 eq.) in ethanol.

^1H NMR spectrum을 비교한 결과를 살펴보면, 대체적으로 proton peak의 움직임이 **IQ18**과 **IQ18-Fe**에서 보인 것과 비슷하였다. 하지만, A-ring에 존재하는 c proton(H_c)의 움직임은 **IQ18**에서 같은 위치의 proton인 d proton(H_d)와 다른 움직임을 보였다. **IQ18-Fe**에서는 이 proton의 peak가 더 downfield로 이동하였던 것과 다르게 **IQ44-Fe**에서 upfield로 이동한 것이다. 이런 비슷한 이동은 **IQ18-S**에서 관찰되었으며

C-ring의 nitrogen 부분에만 electron deficiency 효과가 나타나면서 생긴 것이라고 예측하였다. 따라서 **IQ44-Fe**에서 c proton(H_c)이 upfield로 조금 이동한 것은 앞의 **IQ18-S**의 경우와 같은 맥락에서 봤을 때 thiophene의 sulfur와 Fe^{3+} 가 강하게 complex를 형성하지 못한다고 예상하였다. 실제로도 E-ring에 존재하는 proton peak들이 이동한 정도를 비교해보면(표 S1) furan의 proton은 0.23~0.53 ppm, thiophene의 proton은 0.09~0.16 ppm만큼 이동하였다. 이 수치는 앞서 말한 sulfur가 complex 형성을 강하게 하지 못한다는 말에 부합한다. 또한 quinoline moiety의 proton peak들이 움직인 정도는 thiophene일 때(0.01~0.13 ppm) furan의 경우(0.06~0.16 ppm)보다 작았지만, E-ring의 proton들 만큼 차이가 크진 않았다. 따라서 c proton(H_c)을 제외하고는 **IQ18**과 Fe^{3+} 사이에 얻은 실험 결과와 비슷하기 때문에 **IQ44**와 Fe^{3+} 도 **IQ18**과 같은 방식으로 quinoline moiety의 nitrogen과 thiophene의 sulfur가 electron donor로 작용하여 complex를 형성할 것이라고 예상할 수 있다.⁵⁹

3.5.2 Proposed binding model based on XRD

추가로 **IQ18**과 **IQ18-Fe** 처럼 NOESY spectrum을 비교할 수 없었기 때문에, **IQ44**의 XRD study를 진행하였다(그림 35). 그 결과 한 개의 unit 안에 두 개의 **IQ44**가 서로 엇갈리게 packing 되어있는 모습을 관찰할 수 있었다. **IQ18**의 경우 한 개의 unit이 하나의 **IQ18**로 이루어진 것과는 다른 모습이었다. 따라서 **IQ44**는 **IQ18**과는 다르게 packing 된 후, 두 개의 **IQ44** 사이에 Fe^{3+} 끼어들어간 모델을 고려해볼 수 있다.⁶⁰

참고한 논문⁶⁰에서는 이러한 packing이 Van der Waals 힘에 의해서 유지되고 있을 것이라고 제시하였다. NMR spectrum을 비교한 결과의 경우 IQ18에서 보인 것과 비슷하지만, XRD 결과는 다르기 때문에 IQ44와 Fe³⁺ 사이의 결합 모델이 IQ18에서 제시한 것과 비슷하다고 확실히 말하기엔 어려움이 있다.

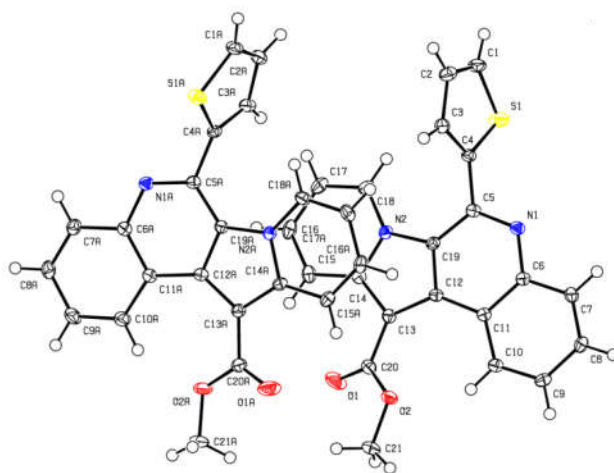


그림 35. ORTEP diagram of the compound IQ44.
(50% probability level for the thermal ellipsoids).

4. Structure–Function Relation

4.1 The role of ester group at B–ring

앞에서 IQ18과 IQ44가 Fe^{3+} 에 선택적으로 작용하는 fluorescent sensor로 사용될 수 있는 가능성을 보았다. 그런데 IQ18은 ratiometric sensor이지만 전체적으로 형광이 감소하는 turn-off sensor였고 IQ44는 형광이 점점 증가하는 turn-on sensor였다. 따라서 어떤 요인에 의해서 turn-on과 turn-off sensor가 되는지 알아보기 위해서 연구를 진행하였다. IQ18과 IQ44 사이에 구조적으로 가장 큰 차이점은 먼저 E–ring에 존재하는 heterocycle이 furan과 thiophene으로 다르다는 것이다. 이에 따라 IQ 물질과 Fe^{3+} 사이의 결합세기가 다르기 때문에 형광의 turn-on과 turn-off같은 상반된 결과가 나올 수 있을 것이라는 가설을 세울 수 있다. 다음으로 큰 차이점은 B–ring에 존재하는 ester group의 유무이다. Oxygen과 sulfur 모두 같은 족에 위치하기 때문에 화학적 특성이 크게 다르지 않을 것이라는 부분을 고려해보면 B–ring에 존재하는 ester group의 영향일 가능성이 높을 것이라고 예측하였다.

두 가지 가설을 모두 확인하기 위해서 initial screening에 사용하였던 IQ44, IQ42 외에 E–ring에 furan을 가지며 B–ring에 ester group이 존재하는 IQB28과 E–ring에 heterocycle 대신 ethyl group이 존재하며 B–ring에 ester group을 갖는 IQB27를 합성하였다. 이렇게 총 4가지 물질을 사용하여 연구를 진행하였다. 4가지 indolizino[3,2–c]quinoline 유도체들에 대하여 metal screening 실험을 하였는데 앞의 IQ18과 IQ44에서 했던 것과는 달리 mithras 기기를 이용하여 빠르게 screening 하였다. IQ 물질마다 최고 absorbance를 나타내는 파장이 다르지만,

4가지 모두 균일하게 420 nm에서 excitation 시키고 450 nm부터 700 nm까지 fluorescence spectrum을 얻었다. 4가지 물질에 대한 screening 역시 ethanol(그림 36)과 수용액(그림 37)에서 모두 진행하였다.

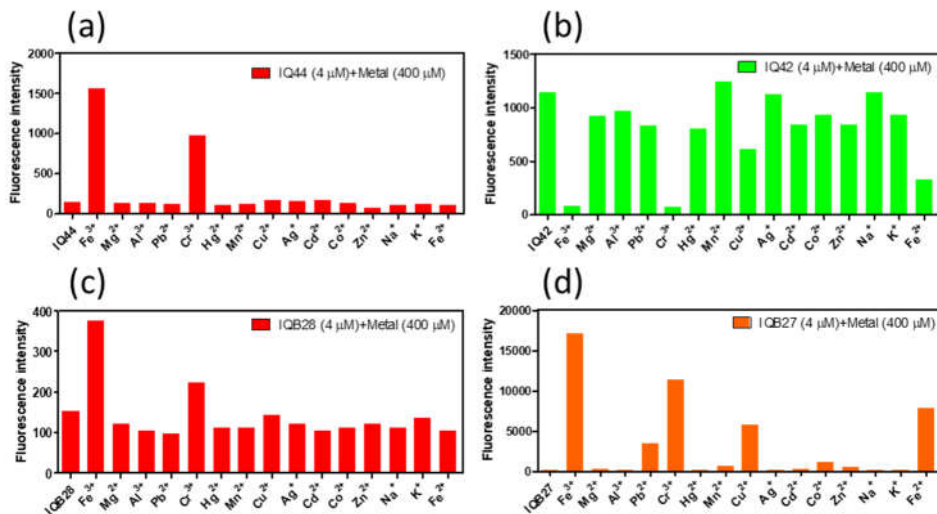


그림 36. Fluorescence response of chemosensor IQ44 (a), IQ42 (b), IQB28 (c), IQB27 (d) excited at 420 nm in the presense of Fe³⁺ and other metal ions (400 μM) in ethanol solutions after incubation for 30 sec. The monitored wavelenghtes were 458 nm, 480 nm, 510 nm and 458 nm, respectively. IQ compounds= 4 μM, slit= 6 nm/12 nm

4가지 indolizino[3,2-*c*]quinoline 유도체들을 사용하여 ethanol에서 screening한 결과(그림 36)에서 **IQ44**는 Fe³⁺와 Cr³⁺을 넣었을 경우 형광의 증가가 있지만, B-ring에 ester group이 존재하지 않는 **IQ42**의

경우 Fe^{3+} 와 Cr^{3+} 에 대해서 형광이 감소한 것을 볼 수 있다. 따라서 IQ44와 IQ42를 비교해보면 B-ring에 존재하는 ester group이 turn-on fluorescent sensor로 작용하는데 큰 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 또한 IQ18과 IQB28은 E-ring에 furan을 공통으로 갖고있으며 구조적 차이점으로는 IQ18의 A-ring에 존재하는 methyl group과 IQB28의 B-ring에 존재하는 methyl ester group이다. 앞에서 봤던 IQ18의 selectivity test 결과(그림 10)와 IQB28의 결과를 비교해봐도 ester group이 있는 IQB28은 Fe^{3+} , Cr^{3+} 를 넣은 경우 IQ44처럼 형광의 증가가 있었지만 IQ18는 Fe^{3+} , Cr^{3+} 에 대하여 형광이 감소하였다. 따라서 IQ44와 IQ42, IQB28과 IQ18 두가지 경우를 모두 봤을 때 B-ring에 존재하는 ester group이 turn-on fluorescent sensor로 작용하는데 중요한 역할을 할 것이라고 예상할 수 있다.

수용액에서도 ethanol에서 얻은 결과와 비슷하게 B-ring에 ester group이 있는 IQ44, IQB28, IQB27의 경우 turn-on 되는 모습을 보여주었다(그림 37). 이 결과 역시 B-ring에 존재하는 ester group이 turn-on sensor로 작용하는데 큰 역할을 한다는 예상을 뒷받침해준다.

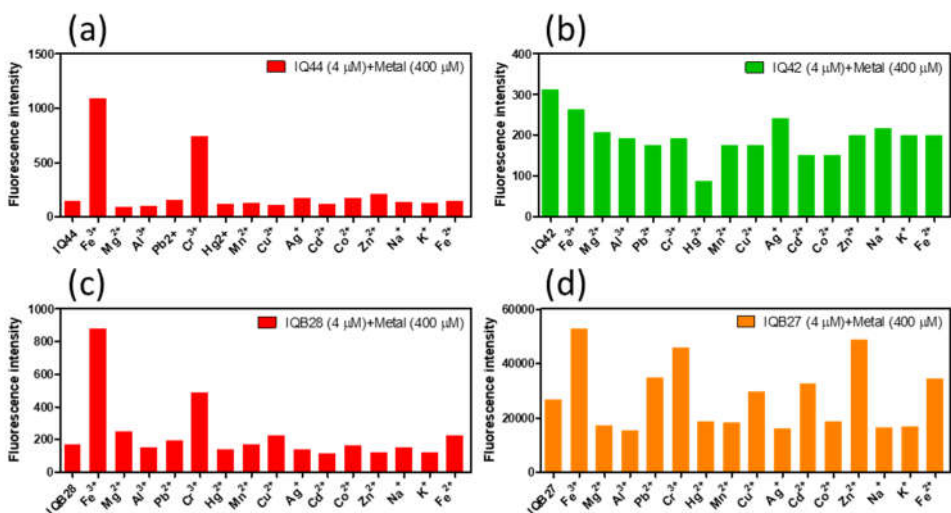


그림 37. Fluorescence response of chemosensor IQ44 (a), IQ42 (b), IQB28 (c), IQB27 (d) excited at 420 nm in the presence of Fe³⁺ and other metal ions (400 μM) in DW solutions after incubation for 30 sec. The monitored wavelengths were 458 nm, 480 nm, 510 nm and 458 nm, respectively. IQ compounds= 4 μM, slit= 6 nm/12 nm

4.2 The role of heterocycle at E-ring

위의 4가지 물질들 중에서 B-ring에 ester group이 존재하는 IQ44, IQB28, IQB27 (그림 36a,c,d, 그림 37a,c,d)을 비교해보면 E-ring위치에 heterocycle이 선택성에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다. IQ44와 IQB28은 각각 thiophene, furan을 갖고 있지만 IQB27은 ethyl group으로 대체되어 있다. IQ44와 IQB28은 Fe³⁺, Cr³⁺에만 선택적으로 작용하여 turn-on 또는 turn-off가 되는 것을 보았다. 그렇지만

IQB27은 형광의 증가 정도가 다르긴 하지만 Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} 를 넣은 경우 모두 형광이 증가하였다(그림 36d, 그림 37d). 뿐만 아니라 Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 를 구분하지 못한다는 점에서 본 연구에서 다뤘던 IQ 유도체들과 달리 Fe^{3+} 에 선택적인 fluorescent sensor로 사용할 수 없다는 한계점을 갖고 있다. 따라서 E-ring에 존재하는 heterocycle은 indolizino[3,2-c]quinoline 유도체들이 selectivity를 갖는데 큰 역할을 한다고 생각할 수 있다.

결론 및 고찰

본 연구실에서는 이번 연구에 앞서 다양한 indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ) 유도체들을 합성하고 이들의 optical property를 연구하였으며³⁵, 이어서 target (DNA, RNA, lysosome) fluorescent probe 논문³⁶을 발표하였다. 이어서 본 연구에서는 주변 환경에 따라서 민감하게 변화하는 indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ) 유도체들의 특징을 활용하여 IQ 유도체들이 특정 금속 이온(Fe^{3+})에 선택적인 fluorescent sensor로 활용될 수 있다는 것을 보였다.

먼저 ratiometric fluorescent sensor로서 Fe^{3+} 에 선택적으로 작용하는 IQ18에 대해서 실험한 결과들을 살펴보았다. IQ18이 Fe^{3+} 에만 선택적으로 작동하는지 살펴보기 위해 총 15가지 금속 이온(Ag^+ , Al^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+})을 사용하여 selectivity test를 진행하였다. 그 결과 Fe^{3+} 외에도 Cr^{3+} 을 넣었을 때도 형광의 감소가 있었다. 이러한 이유는 언급했던 것과 같이 Fe^{3+} 와 Cr^{3+} 모두 trivalent 이온이며 이온 사이즈가 비슷하기 때문이다. 더 나아가 금속 이온의 관점이 아닌 IQ18의 관점에서 살펴보면 Fe^{3+} 와 결합하는 부분의 공간이 넓게 열려있기 때문이라고 생각해볼 수 있다. 따라서 비슷한 크기가 아닌 Cu^{2+} 또는 Pb^{2+} 에 대해서도 약간의 형광 스펙트럼의 변화가 나타난 것이라고 생각해볼 수 있다. Selectivity test에 이어서 Fe^{3+} 를 제외한 다른 금속 이온이 과량 존재하는 조건에서 IQ18과 Fe^{3+} 사이의 결합이 유지 또는 형성이 될 수 있는지 competition test를 통해서 살펴보았다. 그 결과 다른 14가지 금속 이온이 Fe^{3+} 보다 10당량 더 많은 조건에서도 543 nm에서 형광의 균등한 형광의 증가를

측정하였으며 이는 둘 사이의 결합이 다른 금속 이온들에 의해서 방해받지 않는다는 것을 의미한다. Cr^{3+} 에 대해서 cross-selectivity를 보이지만 체내에 Fe^{3+} 가 Cr^{3+} 에 비해서 과량 존재한다는 점을 고려하였을 때 IQ18은 충분히 Fe^{3+} 에 선택적인 fluorescent sensor로 사용될 수 있다고 보여진다.

더 나아가 IQ18과 Fe^{3+} 사이의 결합 모델을 제시하기 위해서 Job's plot 실험을 진행하였으며 이로부터 얻어진 결과와 Benesi-Hildebrand plot에서 보여진 linearity를 바탕으로 1:1 결합한다는 것을 알 수 있었다. 추가로 ^1H NMR titration 실험, IQ18, IQ18-Fe, IQ18-S 세 가지 ^1H NMR spectrum의 비교, 그리고 IQ18, IQ18-Fe 각각의 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum의 비교를 통해서 IQ18과 Fe^{3+} 사이의 결합 모델을 제시하였다.

IQ18에 이어서 IQ44도 Fe^{3+} 에 선택적인 fluorescent sensor로 활용할 수 있는지 알아보았다. IQ44는 IQ18과 달리 ethanol 뿐만 아니라 수용액에서도 Fe^{3+} 를 detection 할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 Fe^{3+} 에 대한 IQ44의 fluorescent sensor로서의 행동을 알아보는 실험들에 있어서 모두 두 가지 solvent에서 진행하였다. Selectivity test, competition test, binding strength, fluorescence intensity에서 모든 결과가 ethanol에서 더 좋거나 높게 나타났다. 이런 결과가 나온 원인은 두 물질 사이의 결합 세기가 수용액에서 ethanol에서보다 약하기 때문에 기인하는 것이라고 보여진다. IQ44와 Fe^{3+} 사이의 결합 모델을 제시하고자 하였다. Job's plot과 ^1H NMR titration study, ^1H NMR spectrum 비교에서 얻은 결과를 바탕으로 예상할 수 있는 모델은

IQ18과 Fe^{3+} 사이의 결합 모델과 비슷하였다. 즉, Quinoline moiety에 존재하는 nitrogen과 thiophene에 존재하는 sulfur가 참여하여 complex를 형성하는 것으로 예측할 수 있었다. 그렇지만 IQ44와 IQ18 사이의 XRD 결과를 비교하였을 때 packing에 들어가는 unit의 결과가 서로 달랐다. 따라서 확실하게 IQ18과 Fe^{3+} 사이에 형성되는 결합과 비슷할 것이라고 단언하기에는 추후 연구를 계속해서 진행중이다.

IQ18, IQ44가 Fe^{3+} 에 대해서 각각 turn-off와 turn-on이 되는 서로 다른 현상을 보인 점에 착안하여 indolizino[3,2-c]quinoline 유도체들의 구조와 fluorescent sensor로 작용할 때 나타나는 현상과의 상관관계 (structure-function relationship)을 밝혔다. B-ring에 ester group이 존재하는 경우와 그렇지 않은 경우, 그리고 E-ring에 heterocycle이 존재하는 경우와 그렇지 않은 경우 이렇게 두 가지 case를 살펴보았다. 그 결과 carboxylic acid ester group이 turn-on sensor에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 또한 IQ 유도체들이 Fe^{3+} 에 대해서 선택성을 갖기 위해서는 E-ring에 5-membered heterocycle이 반드시 필요하다는 것을 보였다.

따라서, 본 연구는 기존에 합성되었던 indolizino[3,2-c]quinoline 유도체들의 활용을 밝힘과 동시에 이들을 fluorescent sensor로 사용하기 위한 design strategy를 제공하였다. E-ring에 heterocycle이 존재하는 IQ 유도체들만 다뤘지만, electron donor로써 작용하는 heteroatom의 존재가 중요하다고 유추해볼 수 있다. B-ring의 ester group 유무와 E-ring의 적절한 위치에 존재하는 heteroatom만 있다면 Fe^{3+} 를 넘어서 더 다양한 ion에 선택적인 fluorescent sensor가 개발 될

수 있을 것이다.

이어서 본 연구는 기존에 fluorescent metal sensor에 많이 사용되던 fluorophore(rhodamine B, fluorescein, Cy2)¹에서 벗어나 새로운 골격인 indolizino[3,2-*c*]quinoline을 활용하여 metal sensor를 개발하였다는 것에 의의가 있다. 또한 본 연구에서 다룬 **IQ44**는 indolizino[3,2-*c*]quinoline 유도체들이 유기용매뿐만 아니라 수용액에서도 충분히 fluorescent metal sensor로 사용될 수 있다는 가능성을 보여주었다. 이는 기존에 발표된 많은 fluorescent sensor들이 유기용매 외에는 작동이 이뤄지지 않는다는 한계를 극복하였다는 것이다. 이러한 한계의 극복은 indolizino[3,2-*c*]quinoline을 활용한 fluorescent sensor의 활용 범위를 넓혀줄 것이다. DNA, RNA, lysosome을 targeting 하는 fluorescent probe³⁶에서 보인 것처럼 IQ 유도체들은 세포 투과성이 뛰어나기 때문에 본 연구에서 보여준 indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ) 기반의 fluorescent sensor 또한 세포 내 Fe^{3+} 와 결합하여 Fe^{3+} 이 참여하는 여러 process를 추적할 수 있는 imaging probe로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

Experimental Section

1. Instrument and materials

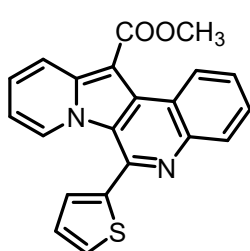
All commercially available reagents and solvents were purchased from chemical suppliers. These reagents and solvents were used without any further purification which purity is ACS grade or higher. The reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica coated plate (60 F254, Merck, Darmstadt, Germany), and components were visualized by UV light at 254 nm and 365 nm (VL-4.LC, Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany). Purification by column chromatography was performed on silica gel 230-400 mesh (ZEOPrep, Zeochem, Lake Zurich, Switzerland) using a mixture of hexane, dichloromethane, ethyl acetate as eluents. ^1H NMR spectra were obtained using JNM-LA300 or JNM-ECA-600 (JEOL, Tokyo, Japan) with CD_3OD or $\text{DMSO}-d_6$ as a solvent at room temperature. (High-resolution mass spectra (HR-MS) were obtained using fast atom bombardments (FAB) method on a JMS-700 MStation (JEOL, Tokyo, Japan) or electrospray ionization (ESI) mass systems.) The UV-vis and fluorescence spectra were obtained using Lamda 25 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and FP-6500 (Jasco, Tokyo, Japan) respectively with 1 cm quartz cell. Metal screening of IQ derivatives (IQ44, IQ42, IQB28, IQB27) were done using Mithras² LB 943 (Berthold, Bad Wildbad, Germany)

2. Synthesis of IQ18 and IQ44

2.1 General procedure

The fluorescent chemosensors, **IQ18** and **IQ44**, were synthesized by the procedure reported in previous paper.³⁵

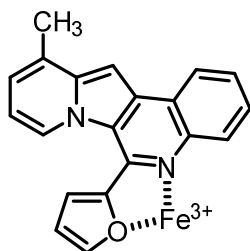
IQ44



¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.6 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.45 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 5.0 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.61–7.58 (m, 1H), 7.54 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 5.1 Hz, 3.7 Hz, 1H), 7.01 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H)

3. Formation of organometallic complex, IQ18–Fe and IQ44–Fe

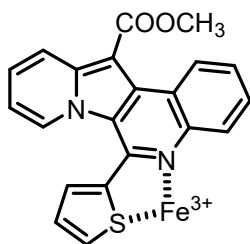
IQ18–Fe



To synthesize the organometallic complex with **IQ18** and Fe³⁺ metal ion, **IQ18** (0.07 mmol) was dissolved in methanol, followed by the addition of Fe(NO₃)₃·9H₂O (0.07 mmol). After it was stirred at room temperature for 12 hours,

there was solid not dissolved in methanol. The reaction mixture was filtered and dried *in vacuo*. Orange solid, ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.65 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.18–8.16 (m, 2H), 7.89 (s, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.11 (s, 2H), 2.63 (s, 3H).

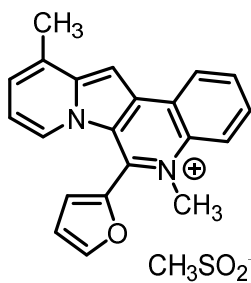
IQ44–Fe



This compound was synthesized using similar procedure except the amount of $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. In this reaction, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.7 mmol) was added in the methanol solution of **IQ44**. Orange solid, ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.62 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.10–8.07 (m, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.80 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 4.05 (s, 3H).

4. Synthesis of N-methylated IQ18, IQ18-S

6-(furan-2-yl)-5,11-dimethylindolizino[3,2-c]quinolin-5-ium
methanesulfinate



IQ18-S was synthesized in one step from **IQ18**. **IQ18** (0.06 mmol) was dissolved in chloroform, followed by the addition of dimethyl sulfate (0.6 mmol). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 hours under reflux.

After the reaction was monitored by TLC, it was stopped even though the **IQ18** remained. The chloroform was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane / methanol) to afford **IQ18-S**. Dark orange solid, ^1H NMR (800 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.88 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 8.48 – 8.41 (m, 2H), 8.12 – 8.06 (m, 2H), 8.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.50 – 7.45 (m, 1H), 7.19 – 7.13 (m, 2H), 6.92 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.19 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 2.67 (s, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 147.68, 146.89, 139.21, 135.03, 134.94, 133.24, 131.63, 130.54, 129.32, 128.51, 125.75, 125.32, 122.19, 121.30, 119.84, 117.85, 115.05, 113.29, 96.36, 52.75, 39.81, 39.70, 39.60, 39.50, 39.39, 39.29, 39.18, 17.80., LC/MS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}^+$ 313.13 ($[\text{M}]^+$), found 313.1200.

5. Single crystal X-ray crystallography

5.1 Single crystal X-ray crystallography of IQ18

The sample of **IQ18** for crystallography was grown by the vapor diffusion method using methanol/hexane. Dark brown single crystals of $C_{20}H_{14}N_2O$, with approximate dimensions $0.229 \times 0.032 \times 0.032$ mm³ were grown. A nylon loop with Paratone-N oil was used for selection of suitable crystal mounted on SuperNova, Dual, Cu at zero, AtlasS2 diffractometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The crystal structure of **IQ18** was analyzed by collecting the data on SuperNova dual source diffractometer using Cu K α radiation ($\lambda = 0.582$ nm⁻¹) in ω scan. A total of 10603 reflections were measured ($8.456^\circ \leq 2\theta \leq 152.748^\circ$) with 1° steps. Structural solution and refinement were performed with the ShelXT using intrinsic phasing and the SheXL using least squares minimization refinement package of OLEX2, respectively. The final R_1 , 0.0452 ($I > 2\sigma(I)$), and wR_2 , 0.1390 (all data), were obtained through a total of 3497 unique ($R_{int} = 0.0238$, $R_{sigma} = 0.0239$) used in all calculations. Data of **IQ18** structure showed in the paper was uploaded and deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. The deposition number for **IQ18** is No. CCDC1533134. All copies of the data can be downloaded upon application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK

5.2 Single crystal X-ray crystallography of IQ44

The sample of **IQ44** for crystallography was grown by the vapor diffusion method using methanol and dichloromethane/hexane. Light yellow single crystals of $C_{21}H_{14}N_2O_2S$, with approximate dimensions $0.397 \times 0.308 \times 0.203 \text{ mm}^3$ were grown. A nylon loop with Paratone-N oil was used for selection of suitable crystal mounted on SuperNova, Dual, Cu at zero, AtlasS2 diffractometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The crystal structure of **IQ44** was analyzed by collecting the data on SuperNova dual source diffractometer using Cu $K\alpha$ radiation ($\lambda = 1.912 \text{ \AA}$) in ω scan. A total of 62202 reflections were measured ($7.974^\circ \leq 2\theta \leq 147.79^\circ$) with 1° steps. Structural solution and refinement were performed with the ShelXT using intrinsic phasing and the SheXL using least squares minimization refinement package of OLEX2, respectively. The final R_1 , 0.0378 ($I > 2\sigma(I)$), and wR_2 , 0.1035 (all data), were obtained through a total of 6595 unique ($R_{\text{int}} = 0.0255$, $R_{\text{sigma}} = 0.0097$) used in all calculations. The deposition number for **IQ44** is No. CCDC1813169. All copies of the data can be downloaded upon application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK

6. UV–vis and fluorescence spectra measurement

Metal ions ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 , KBr , NaCl , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , HgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , AlPO_4 , $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) were used to prepare stock solution (10 mM) in water. The stock solution of **IQ18** and **IQ44** (10 mM) was prepared in DMSO at room temperature. And the stock solutions of metal ions and **IQ18** was diluted using water and DMSO by serial dilution to yield 2 mM and 1 mM stock solutions. The general procedures to obtain spectra were as follows: 1 μL of IQ stock solutions (2 mM and 10 mM) was added into 999 μL ethanol solvent in 1 cm quartz cell to be given 2 μM and 10 μM IQ solutions used in fluorescent and UV–vis measurement, respectively. Proper volume of metal stock solutions (1mM, 2mM and 10mM in water) was transferred to 2 μM and 10 μM IQ solutions to achieve the wanted equivalent. The slit widths of excitation and emission were 3 nm and 5 nm respectively with medium sensitivity. All experiments were recorded after equilibrium for 30 seconds unless otherwise stated.

Reference

1. Sahoo, S. K.; Sharma, D.; Bera, R. K.; Crisponi, G.; Callan, J. F., Iron(III) selective molecular and supramolecular fluorescent probes. *Chem Soc Rev* **2012**, *41* (21), 7195–227.
2. Tesfaldet, Z. O.; van Staden, J. F.; Stefan, R. I., Sequential injection spectrophotometric determination of iron as Fe(II) in multi-vitamin preparations using 1,10-phenanthroline as complexing agent. *Talanta* **2004**, *64* (5), 1189–95.
3. Gomes, D. M.; Segundo, M. A.; Lima, J. L.; Rangel, A. O., Spectrophotometric determination of iron and boron in soil extracts using a multi-syringe flow injection system. *Talanta* **2005**, *66* (3), 703–11.
4. K. Akatsuka, J. W. M., J. W. Lam and S. S. Berman, Determination of Iron and Ten Other Trace Elements in Open Ocean Seawater Reference Material NASS-3 by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1992**, *7*, 889–894.
5. Berg, K. Y. a. C. M. G. V. d., The Determination of Iron in Seawater Using Catalytic Cathodic Stripping Voltammetry. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 65–69.
6. Bobrowski, A.; Nowak, K.; Zarebski, J., Application of a bismuth film electrode to the voltammetric determination of trace iron using a Fe(III)–TEA–BrO₃[–] catalytic system. *Anal Bioanal Chem* **2005**, *382* (7), 1691–7.

7. Ohashi, A.; Ito, H.; Kanai, C.; Imura, H.; Ohashi, K., Cloud point extraction of iron(III) and vanadium(V) using 8-quinolinol derivatives and Triton X-100 and determination of $10(-7)$ mol dm (-3) level iron(III) in riverine water reference by a graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Talanta* **2005**, *65* (2), 525-30.
8. Tumambac, G. E.; Rosencrance, C. M.; Wolf, C., Selective metal ion recognition using a fluorescent 1,8-diquinolynaphthalene-derived sensor in aqueous solution. *Tetrahedron* **2004**, *60* (49), 11293-11297.
9. Kaur, K.; Saini, R.; Kumar, A.; Luxami, V.; Kaur, N.; Singh, P.; Kumar, S., Chemodosimeters: An approach for detection and estimation of biologically and medically relevant metal ions, anions and thiols. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256* (17-18), 1992-2028.
10. Datta, B. K.; Thiagarajan, D.; Ramesh, A.; Das, G., A sole multi-analyte receptor responds with three distinct fluorescence signals: traffic signal like sensing of Al(3+), Zn(2+) and F(-). *Dalton Trans* **2015**, *44* (29), 13093-9.
11. Weinstein, D. A.; Roy, C. N.; Fleming, M. D.; Loda, M. F.; Wolfsdorf, J. I.; Andrews, N. C., Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* **2002**, *100* (10), 3776-81.
12. Sucak, G. T.; Yegin, Z. A.; Ozkurt, Z. N.; Aki, S. Z.; Karakan, T.; Akyol, G., The role of liver biopsy in the workup of liver dysfunction late after SCT: is the role of iron overload

underestimated? *Bone Marrow Transplant* **2008**, *42* (7), 461–7.

13. Agarwal, R.; Vasavada, N.; Sachs, N. G.; Chase, S., Oxidative stress and renal injury with intravenous iron in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* **2004**, *65* (6), 2279–89.

14. von Haehling, S.; Jankowska, E. A.; van Veldhuisen, D. J.; Ponikowski, P.; Anker, S. D., Iron deficiency and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* **2015**, *12* (11), 659–69.

15. Qiuju Liu, L. S., Yi Tan, Guanjun Wang, Xu Lin, Lu Cai, Role of Iron Deficiency and Overload in the Pathogenesis of Diabetes and Diabetic Complications. *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16* (1), 113–129.

16. Berg, D.; Gerlach, M.; Youdim, M. B. H.; Double, K. L.; Zecca, L.; Riederer, P.; Becker, G., Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* **2001**, *79* (2), 225–236.

17. Bartzokis G, C. J., Markham CH, et al, MRI evaluation of brain iron in earlier– and later–onset Parkinson's disease and normal subjects. *Magn Reson Imaging* **1999**, *17* (2), 213–222.

18. Bartzokis, G.; Tishler, T. A., MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **2000**, *46* (4), 821–33.

19. Muller, M.; Leavitt, B. R., Iron dysregulation in Huntington's disease. *J Neurochem* **2014**, *130* (3), 328–50.

20. Bartzokis G, S. D., Cummings J, et al, In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging.

Arch Gen Psychiatry **2000**, *57*(1), 47–53.

21. Bartzokis G, S. D., Mintz J, et al., In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer's disease and normal subjects using MRI. *Biol Psychiatry* **1994**, *35*(7), 480–487.

22. Silvestri, L.; Camaschella, C., A potential pathogenetic role of iron in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **2008**, *12* (5A), 1548–50.

23. Siah, C. W.; Trinder, D.; Olynyk, J. K., Iron overload. *Clin Chim Acta* **2005**, *358* (1–2), 24–36.

24. Wang, J.; Pantopoulos, K., Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* **2011**, *434* (3), 365–81.

25. Sen, S.; Sarkar, S.; Chattopadhyay, B.; Moirangthem, A.; Basu, A.; Dhara, K.; Chattopadhyay, P., A ratiometric fluorescent chemosensor for iron: discrimination of Fe²⁺ and Fe³⁺ and living cell application. *Analyst* **2012**, *137* (14), 3335–42.

26. Lee, S.; Jang, H.; Lee, J.; Jeon, S. H.; Sohn, Y.; Ra, C. S., Selective and sensitive morpholine-type rhodamine B-based colorimetric and fluorescent chemosensor for Fe(III) and Fe(II). *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *248*, 646–656.

27. Crumblis, H. B. a. A. L., Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* **2002**, *15*, 325–339.

28. Sahoo, S. K.; Baral, M., Dioxotetraamines derived molecular and supramolecular devices. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2009**, *10* (1), 1–20.

29. Zhang, X.; Shiraishi, Y.; Hirai, T., Fe(III)– and Hg(II)– selective dual channel fluorescence of a rhodamine–azacrown ether

conjugate. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (26), 4178–4181.

30. Dong, L.; ChongWu; Zeng, X.; Mu, L.; Xue, S.-F.; Tao, Z.; Zhang, J.-X., The synthesis of a rhodamine B schiff-base chemosensor and recognition properties for Fe³⁺ in neutral ethanol aqueous solution. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *145* (1), 433–437.

31. Sivaraman, G.; Sathiyaraja, V.; Chellappa, D., Turn-on fluorogenic and chromogenic detection of Fe(III) and its application in living cell imaging. *Journal of Luminescence* **2014**, *145*, 480–485.

32. Shi, D.; Ni, M.; Luo, J.; Akashi, M.; Liu, X.; Chen, M., Fabrication of novel chemosensors composed of rhodamine derivative for the detection of ferric ion and mechanism studies on the interaction between sensor and ferric ion. *Analyst* **2015**, *140* (4), 1306–13.

33. Jin, X.; Wang, S.; Yin, W.; Xu, T.; Jiang, Y.; Liao, Q.; Xia, X.; Liu, J., A highly sensitive and selective fluorescence chemosensor for Fe³⁺ based on rhodamine and its application in vivo imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *247*, 461–468.

34. Wang, L.; Ye, D.; Li, W.; Liu, Y.; Li, L.; Zhang, W.; Ni, L., Fluorescent and colorimetric detection of Fe(III) and Cu(II) by a difunctional rhodamine-based probe. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2017**, *183*, 291–297.

35. Park, S.; Kwon, D. I.; Lee, J.; Kim, I., When Indolizine Meets Quinoline: Diversity-Oriented Synthesis of New Polyheterocycles and Their Optical Properties. *ACS Comb Sci* **2015**, *17* (8), 459–69.

36. Kwon, S.; Kwon, D. I.; Jung, Y.; Kim, J. H.; Lee, Y.; Lim, B.; Kim, I.; Lee, J., Indolizino[3,2- c]quinolines as environment-sensitive fluorescent light-up probes for targeted live cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *252*, 340–352.
37. Sheng, H.; Meng, X.; Ye, W.; Feng, Y.; Sheng, H.; Wang, X.; Guo, Q., A water-soluble fluorescent probe for Fe(III): Improved selectivity over Cr(III). *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *195*, 534–539.
38. A. PECHOVA, L. P., Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinari Medicina* **2007**, *52* (1), 1–18\.
39. Sareen S. Gropper, J. L. S., *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 6th edition ed.; Wadsworth: 2013; p 481.
40. Kumar, P.; Kumar, V.; Gupta, R., Selective fluorescent turn-off sensing of Pd²⁺ ion: applications as paper strips, polystyrene films, and in cell imaging. *RSC Advances* **2017**, *7* (13), 7734–7741.
41. Singh, S.; Reddy, T. S.; Panwar, R.; Misra, R.; Pratap, R., 2-(2,2-Bis-benzylamino-1-cyano-vinyl)-benzonitrile: A Selective Turn-off Fluorescent Cu²⁺Sensor. *ChemistrySelect* **2016**, *1* (11), 2576–2580.
42. Isaad, J.; El Achari, A., A water soluble fluorescent BODIPY dye with azathia-crown ether functionality for mercury chemosensing in environmental media. *Analyst* **2013**, *138* (13), 3809–19.
43. Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H., A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons.

J Am Chem Soc **1949**, *71* (8), 2703–2707.

44. Volker Thomsen, D. S., David Mercuro, Limits of Detection in Spectroscopy. *Spectroscopy* **2003**, *18* (12), 112–114.

45. Mikata, Y.; Nakanishi, K.; Nakagaki, F.; Kizu, A.; Konno, H., Off–On, Ratiometric, and On–Off Fluorescence Responses of Thioether–Linked Bisquinolines toward Hg²⁺ and Fe³⁺ Ions. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2015**, *2015* (22), 3769–3780.

46. Wu, Y.–S.; Li, C.–Y.; Li, Y.–F.; Li, D.; Li, Z., Development of a simple pyrene–based ratiometric fluorescent chemosensor for copper ion in living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *222*, 1226–1232.

47. Job, P., Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. *Annali di Chimica* **1928**, *9*, 113–203.

48. Renny, J. S.; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B., Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52* (46), 11998–2013.

49. Yang, X.; Zhang, Y.; Li, Y.; Liu, X.; Mao, J.; Yuan, Y.; Cui, Y.; Sun, G.; Zhang, G., A diketopyrrolopyrrole–based fluorescence turn–on probe for the detection of Pb²⁺ in aqueous solution and living cells. *RSC Advances* **2016**, *6* (57), 52004–52008.

50. Roy, N.; Nath, S.; Dutta, A.; Mondal, P.; Paul, P. C.; Singh, T. S., A highly efficient and selective coumarin based fluorescent probe for colorimetric detection of Fe³⁺ and fluorescence dual sensing of

Zn²⁺ and Cu²⁺. *RSC Advances* **2016**, *6* (68), 63837–63847.

51. Gao, G.-y.; Qu, W.-j.; Shi, B.-b.; Lin, Q.; Yao, H.; zhang, Y.-m.; Chang, J.; Cai, Y.; wei, T.-b., A reversible fluorescent chemosensor for iron ions based on 1H-imidazo [4,5-b] phenazine derivative. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *213*, 501–507.

52. Yang, X.; Chen, X.; Lu, X.; Yan, C.; Xu, Y.; Hang, X.; Qu, J.; Liu, R., A highly selective and sensitive fluorescent chemosensor for detection of CN⁻, SO₃²⁻ and Fe³⁺ based on aggregation-induced emission. *Journal of Materials Chemistry C* **2016**, *4* (2), 383–390.

53. Kao, S.-L.; Venkatesan, P.; Wu, S.-P., A highly selective fluorescent sensor for Hg(ii) based on an NTe₂ chelating motif and its application to living cell imaging. *New Journal of Chemistry* **2015**, *39* (5), 3551–3557.

54. Abraham, R. J.; Reid, M., ¹H chemical shifts in NMR. Part 18.1 Ring currents and π -electron effects in hetero-aromatics. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2002**, (6), 1081–1091.

55. Strickland S, P. G., Massey V, Determination of dissociation constants and specific rate constants of enzyme–substrate (or protein–ligand) interactions from rapid reaction kinetic data. *J. Biol. Chem.* **1975**, *10*, 4048–4052.

56. Guilfoyle, A. P.; Deshpande, C. N.; Schenk, G.; Maher, M. J.; Jormakka, M., Exploring the correlation between the sequence composition of the nucleotide binding G5 loop of the FeoB GTPase domain (NFeoB) and intrinsic rate of GDP release. *Biosci Rep* **2014**,

34 (6), e00158.

57. Kapur, S. S., P, Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical antipsychotic action. *J. Psych. Neurosci* **2000**, *25* (2), 161–166.

58. Sun, T.; Niu, Q.; Guo, Z.; Li, T., A simple highly sensitive and selective turn-on fluorescent chemosensor for the recognition of Pb²⁺. *Tetrahedron Letters* **2017**, *58* (3), 252–256.

59. Zheng, L.; Hua, R., Modular assembly of ring-fused and pi-extended phenanthroimidazoles via C–H activation and alkyne annulation. *J Org Chem* **2014**, *79* (9), 3930–6.

60. Balamurugan, G.; Velmathi, S.; Thirumalaivasan, N.; Wu, S. P., New phenazine based AIE probes for selective detection of aluminium(iii) ions in presence of other trivalent metal ions in living cells. *Analyst* **2017**, *142* (24), 4721–4726.

Supporting information

1. Initial screening of IQ derivatives

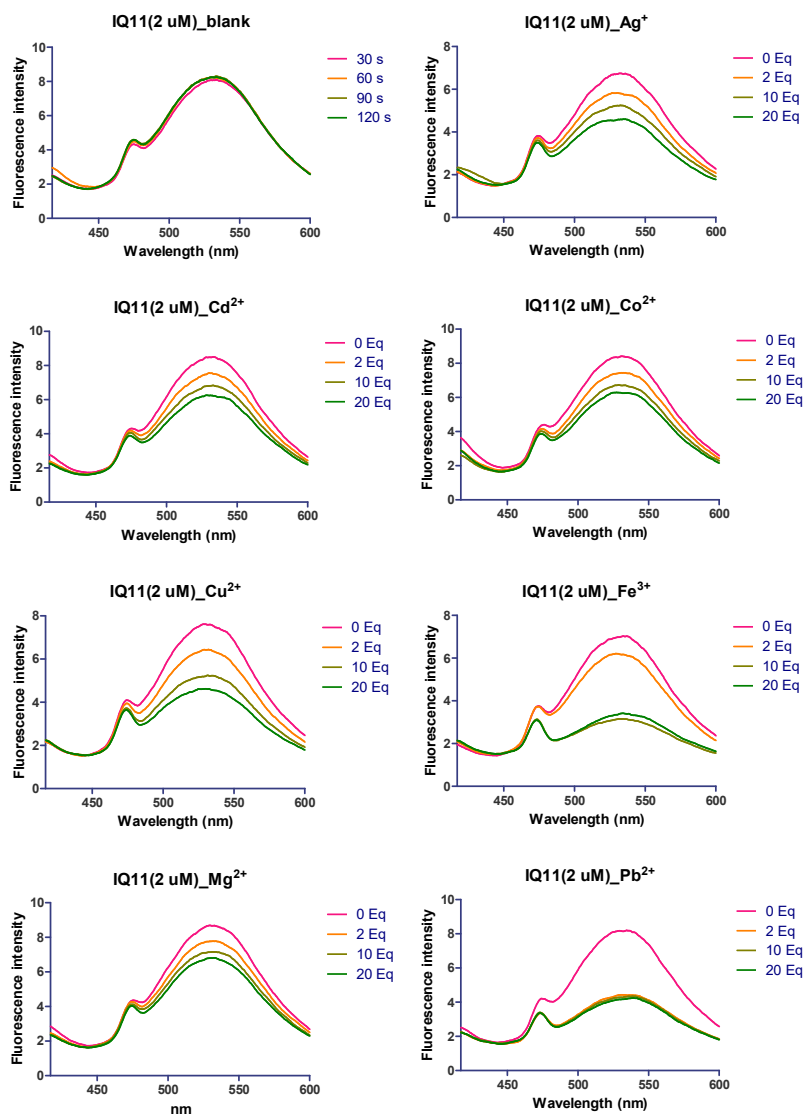


그림 S1. Change of fluorescence spectra of IQ11(2 μ M) with various metal cations in H₂O

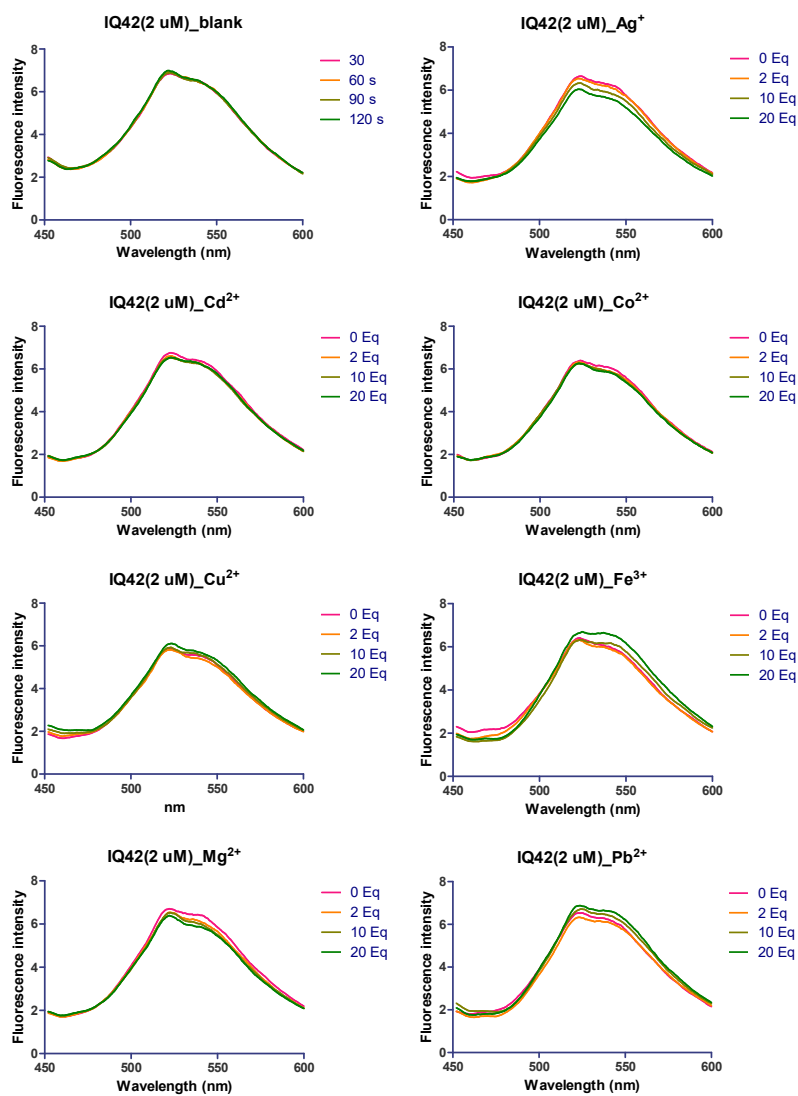


그림 S2. Change of fluorescence spectra of IQ42(2 μ M) with various metal cations in H₂O

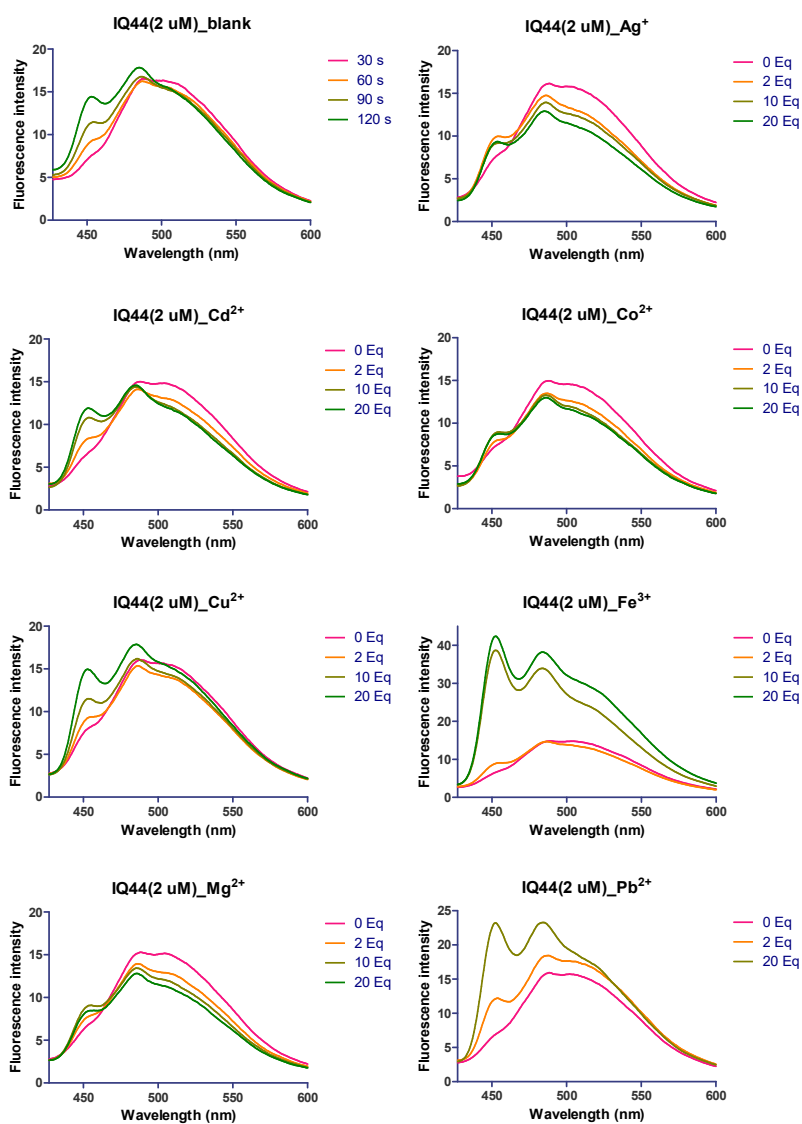


그림 S3. Change of fluorescence spectra of IQ44 (2 μM) with various metal cations in H_2O

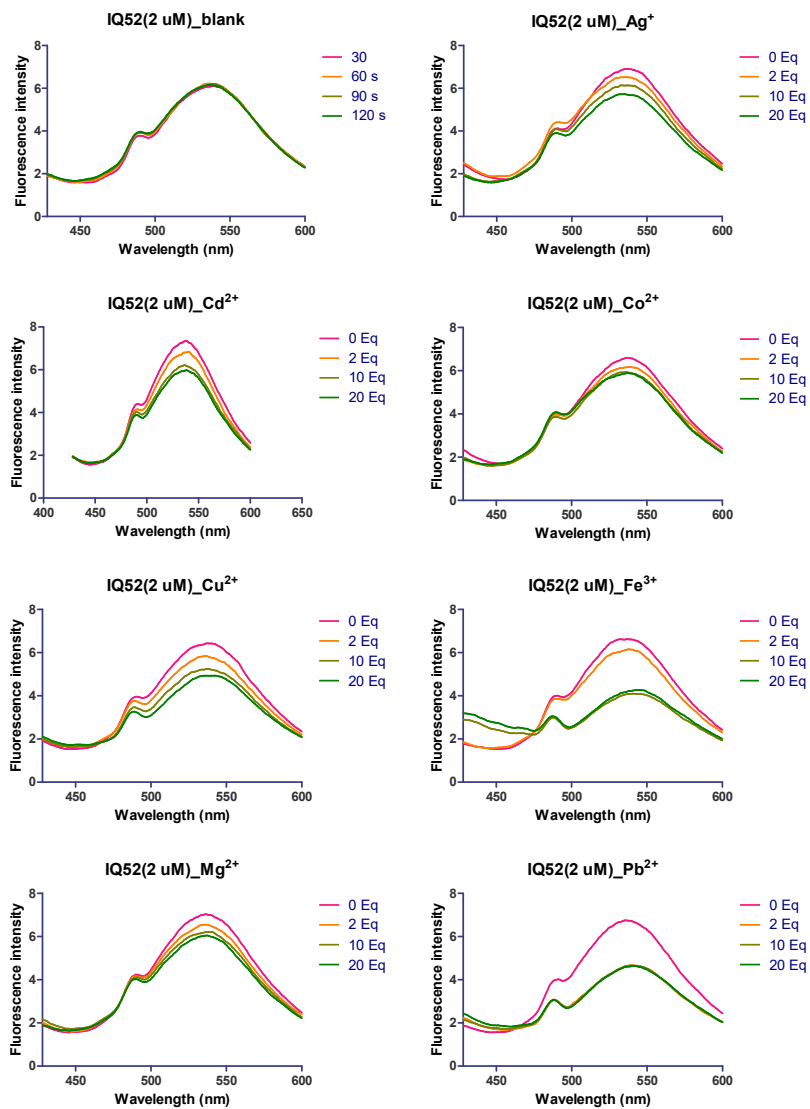


그림 S4. Change of fluorescence spectra of IQ52(2 μ M) with various metal cations in H₂O

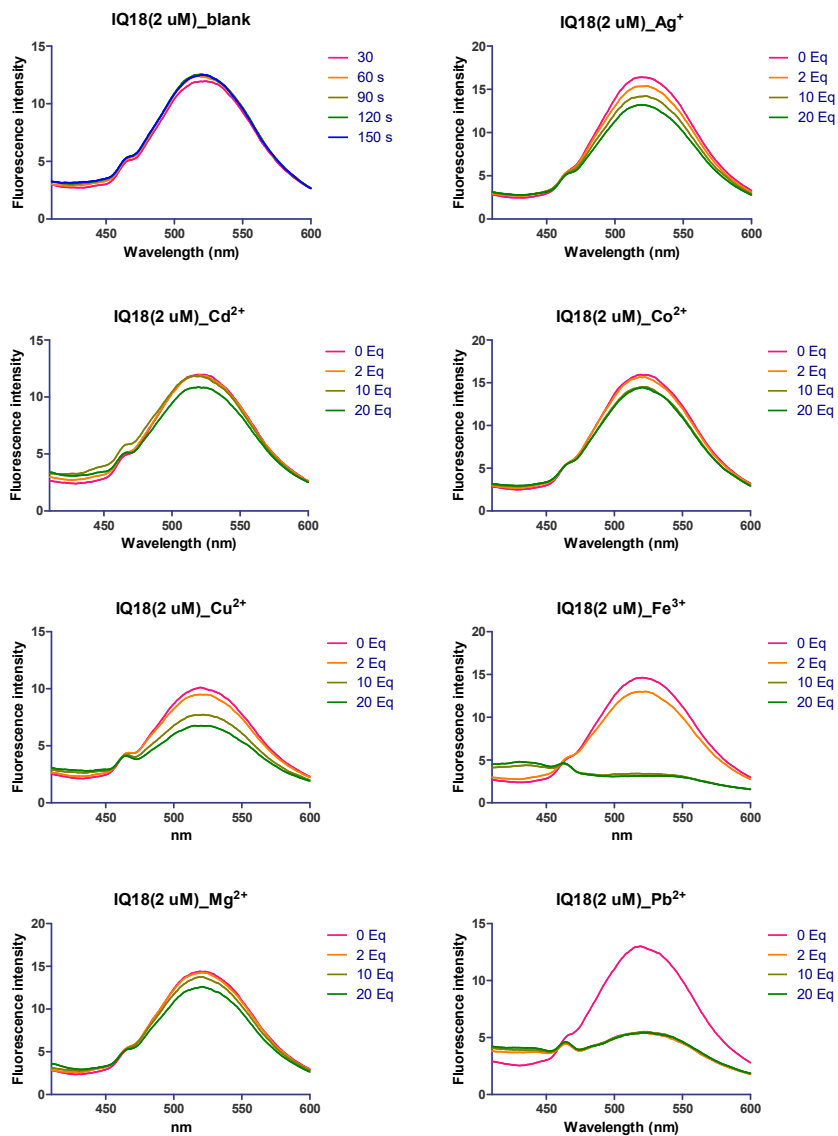


그림 S5. Change of fluorescence spectra of IQ18(2 μ M) with various metal cations in H₂O

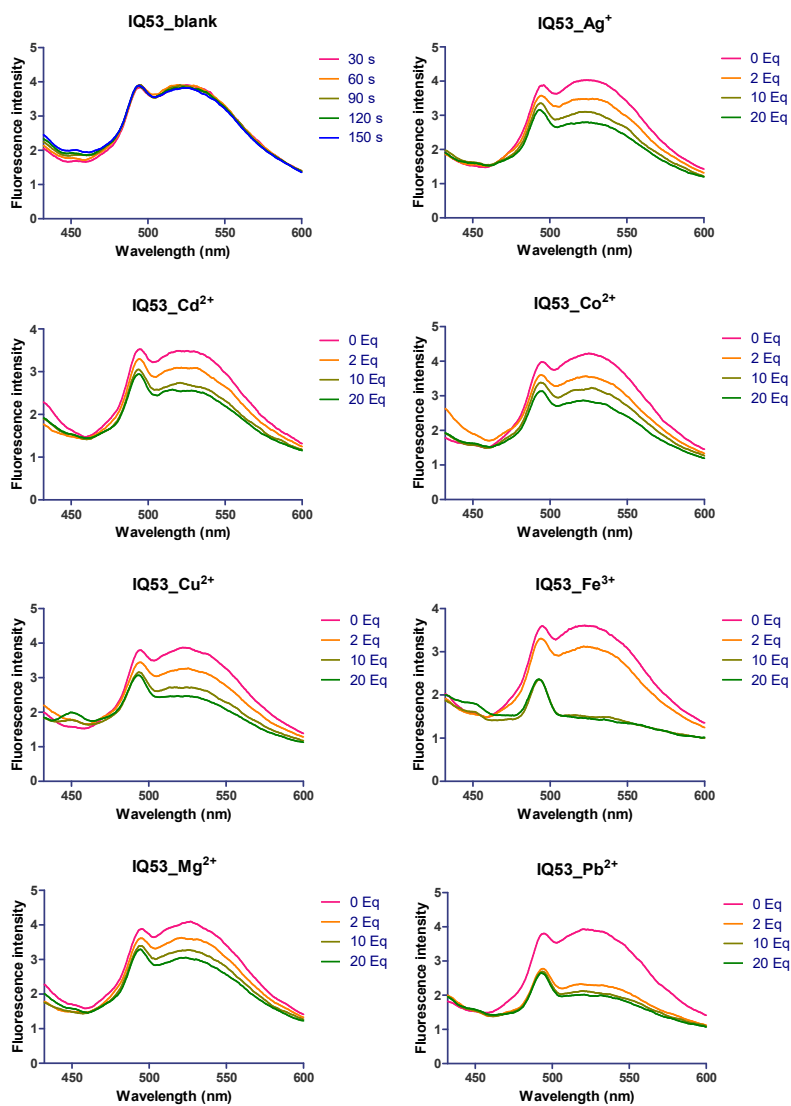


그림 S6. Change of fluorescence spectra of IQ53(2 μ M) with various metal cations in H_2O

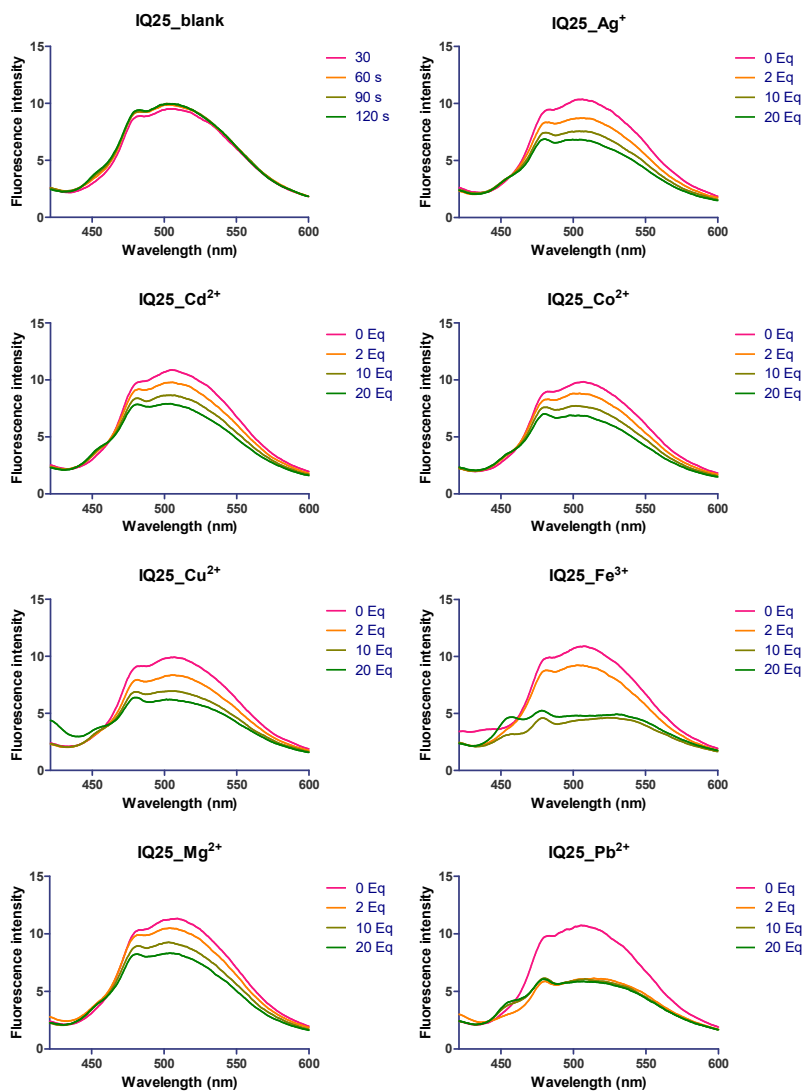


그림 S7. Change of fluorescence spectra of IQ25 (2 μ M) with various metal cations in H₂O

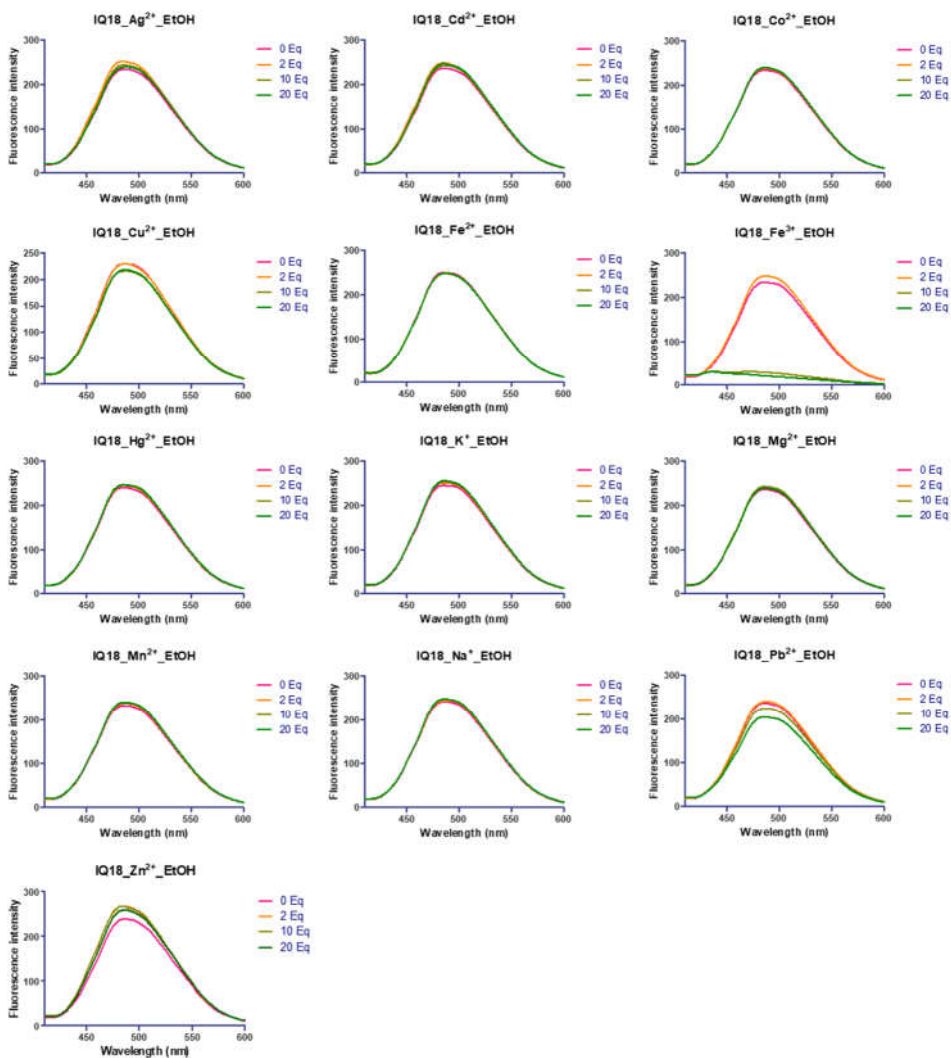


그림 S8. Change of fluorescence spectra of IQ18(2 μ M) with various metal cations in ethanol

2. Ratiometric fluorescent sensor, IQ18

2.1 Competition test

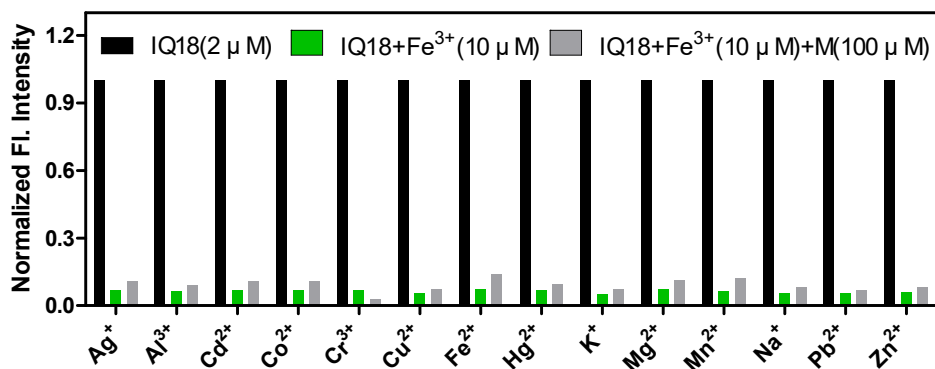


그림 S9. Competitive studies of the IQ18 (2 μ M) in ethanol upon the addition of various metal ions. Green bars indicate the fluorescence response of IQ18 to Fe³⁺ (10 μ M). Grey bars represent the subsequent addition of different metal ions (100 μ M) in the presence of Fe³⁺ ion, respectively; $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 486$ nm, slit width =

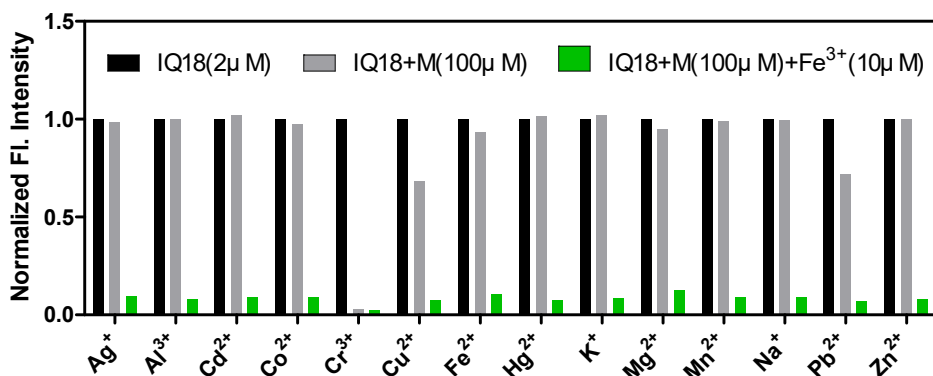


그림 S10. Competitive studies of the IQ18 ($2\ \mu\text{M}$) in ethanol upon the addition of various metal ions. Grey bars indicate the fluorescence response of IQ18 to different metal ions ($100\ \mu\text{M}$). Green bars represent the addition of Fe^{3+} ($10\ \mu\text{M}$) ions following the addition of other metal ions, respectively; $\lambda_{\text{ex}} = 400\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 486\ \text{nm}$, slit width = $3\ \text{nm} / 5\ \text{nm}$

2.2 Benesi–Hildebrand plot (Raw data)

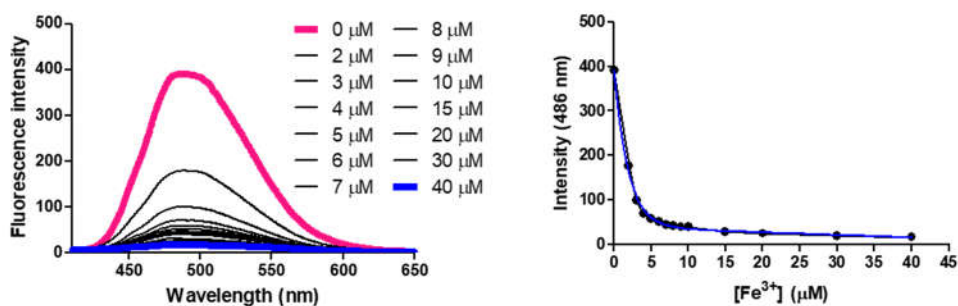


그림 S11. Change of fluorescence spectra of IQ18 ($2\ \mu\text{M}$) (a) and fluorescence intensity of IQ18 at $486\ \text{nm}$ against $[\text{Fe}^{3+}]$ (b) in ethanol; $\lambda_{\text{ex}} = 400\ \text{nm}$, slit width = $3\ \text{nm}/5\ \text{nm}$

2.3 Fluorescence spectra of Job's plot

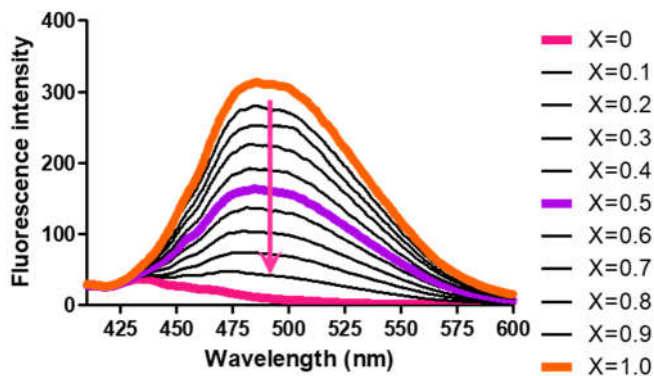


그림 S12. Fluorescence spectrum upon the ratio of IQ18 ($[\text{IQ18}]/([\text{IQ18}] + [\text{Fe}^{3+}])$) in ethanol; total concentration of all mixture solutions = $2 \mu\text{M}$

2.4 Fluorescence spectra of reversibility test

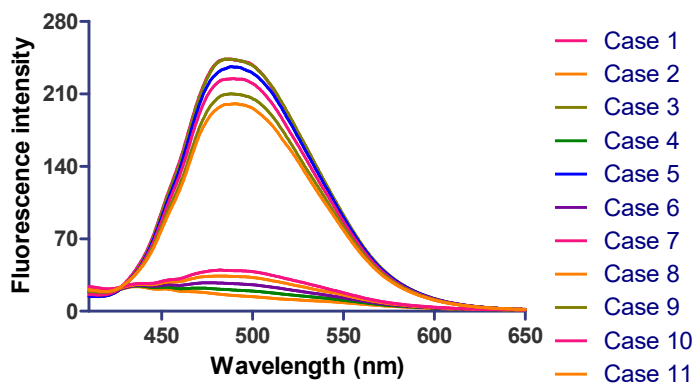


그림 S13. Fluorescence spectrum of each case.

2.5 NMR spectra

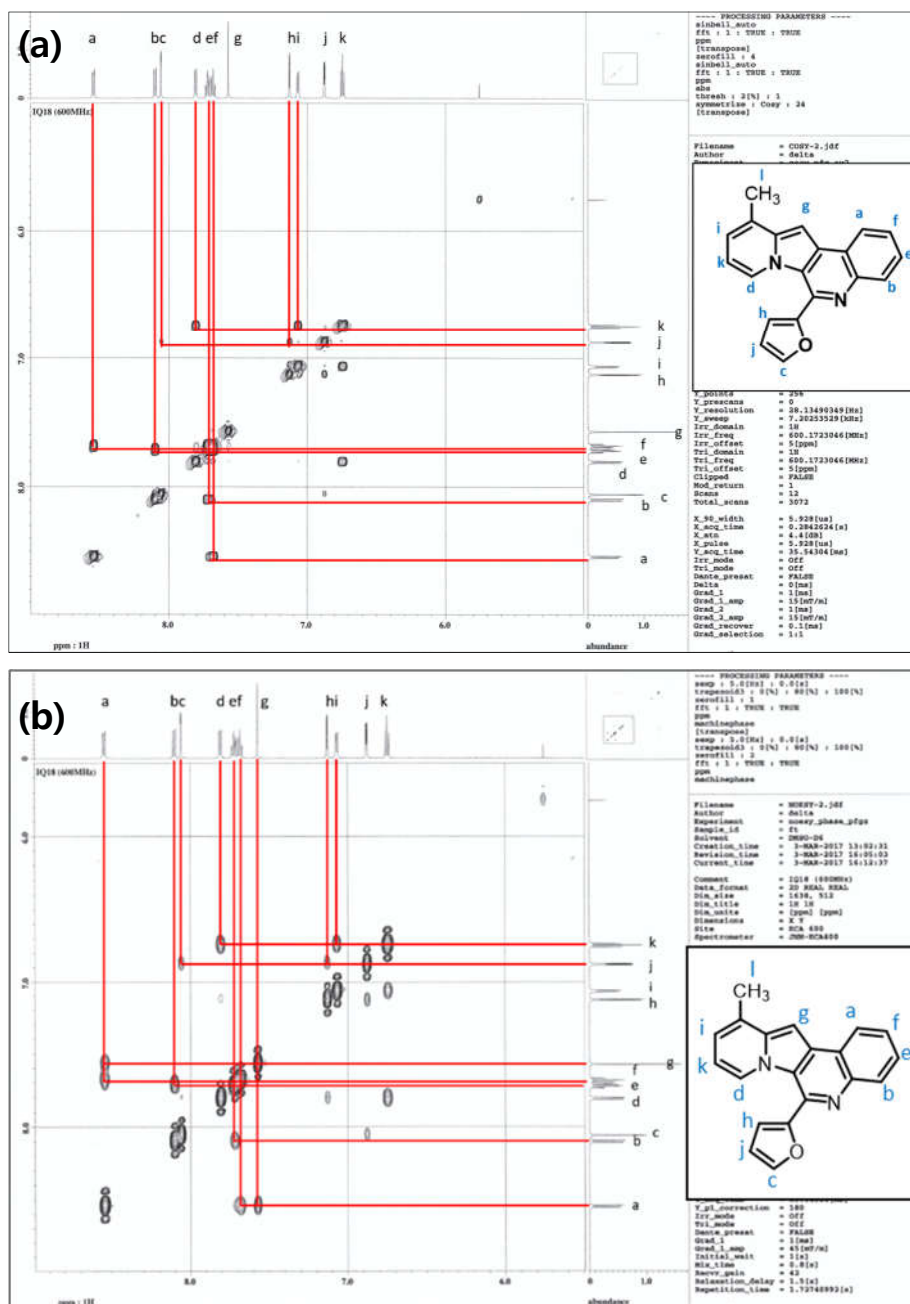


그림 S14. ^1H - ^1H COSY (a), NOESY(b) NMR spectrum of IQ18 in DMSO- d_6 .

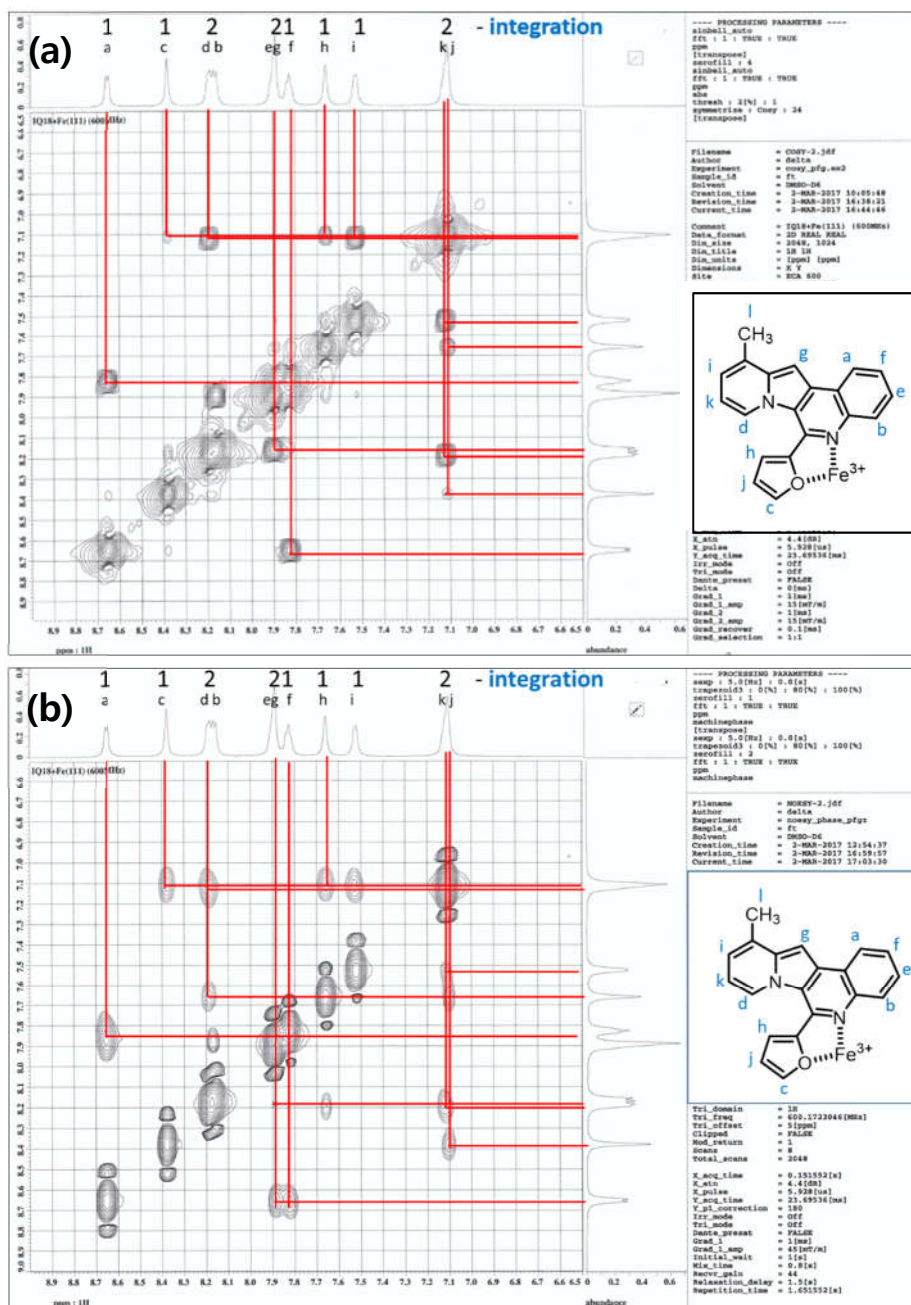


그림 S15. ¹H-¹H COSY(a), NOESY(b) NMR spectrum of IQ18-Fe in DMSO-*d*₆

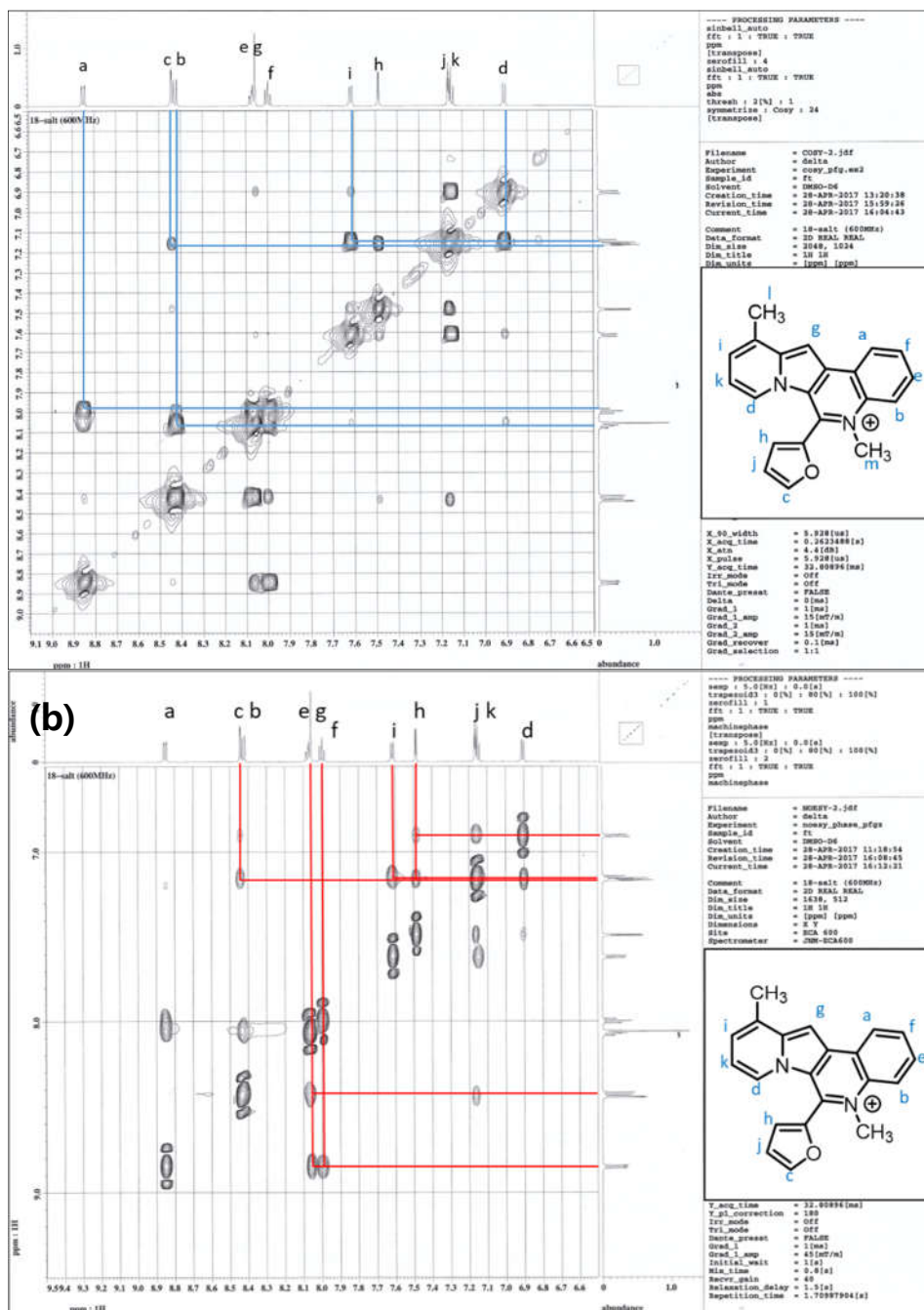


그림 S16. ^1H - ^1H COSY(a), NOESY(b) spectrum of IQ18-S in $\text{DMSO}-d_6$

3. Turn-on fluorescent sensor, IQ44

3.1 Fluorescence spectrum of IQ44

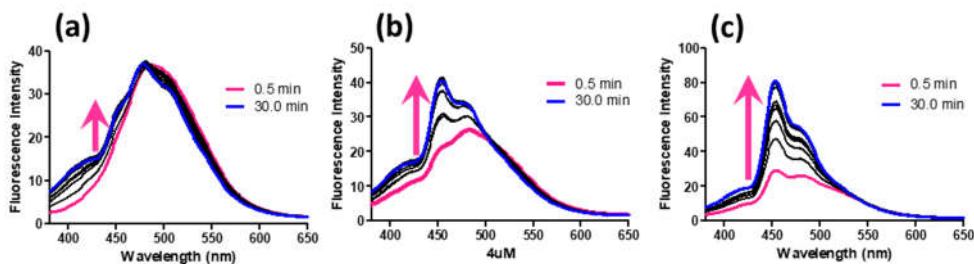


그림 S17. Changes in the fluorescence spectra of IQ44 ($2 \mu\text{M}$) with 0 μM (a), 4 μM (b), 20 μM (c) Fe^{3+} for 30 minutes in DW; $\lambda_{\text{ex}}=370 \text{ nm}$, slit width = 3 nm/5 nm

3.2 Selectivity test

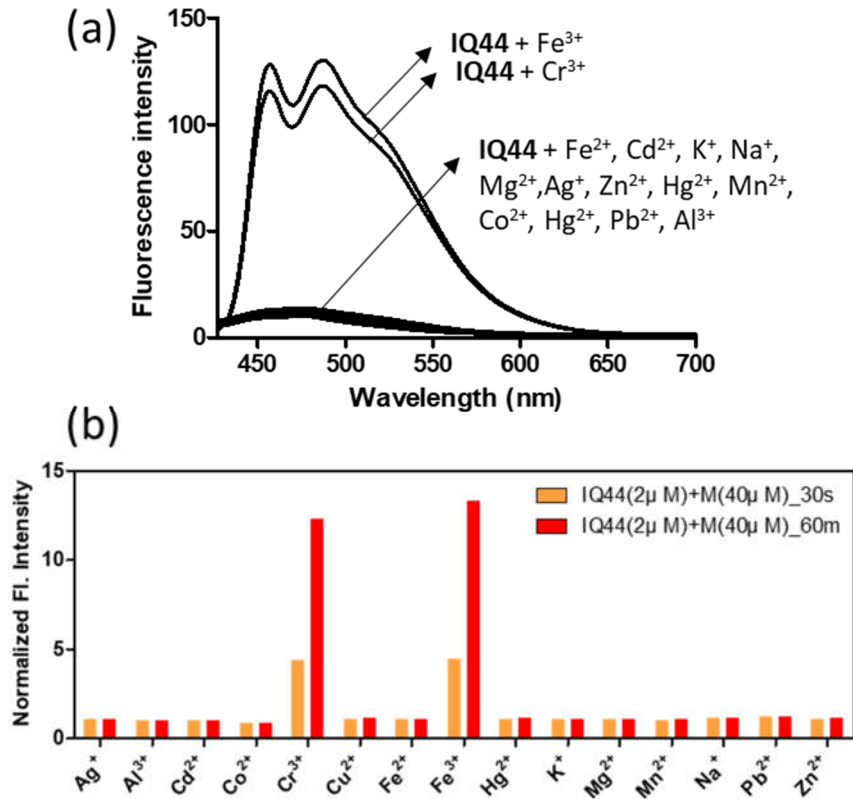


그림 S18. Fluorescence response of chemosensor IQ44 (2 μ M) in the presence of Fe³⁺ and other metal ions (40 μ M) in ethanol solutions after 60 min (a) and the normalized fluorescence intensity at 457 nm after 30 sec and 60 min (b). λ_{ex} = 417 nm, Slit width = 3 nm/5 nm

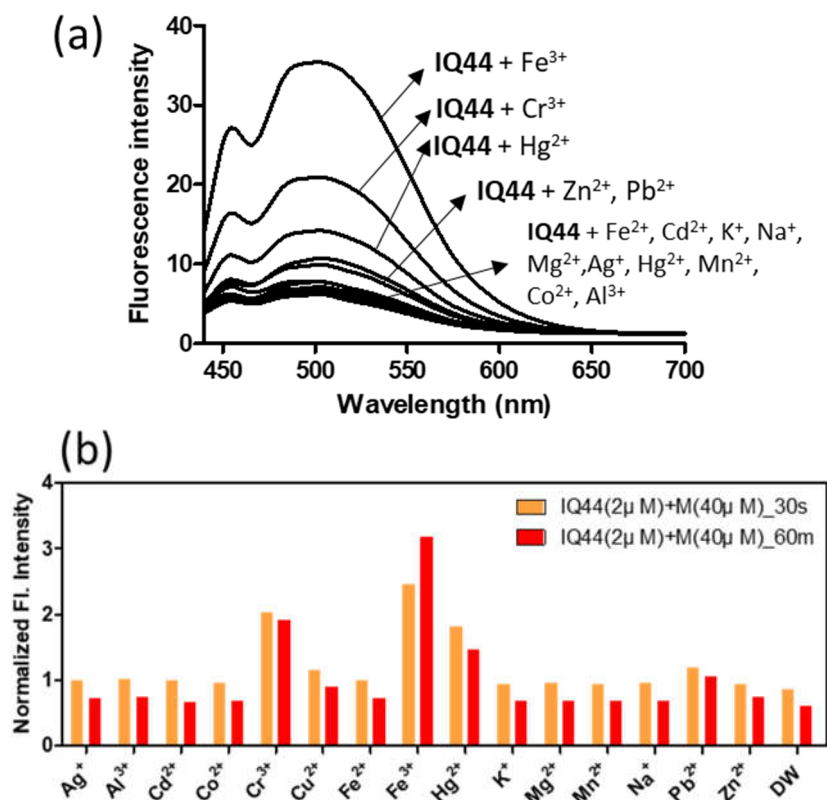


그림 S19. Fluorescence response of chemosensor IQ44 (2 μM) in the presence of Fe³⁺ and other metal ions (40 μM) in DW solutions after 60 min (a) and the normalized fluorescence intensity at 455 nm after 30 sec and 60 min (b). λ_{ex} = 430 nm, Slit = 3 nm/5 nm

3.3 Competition test

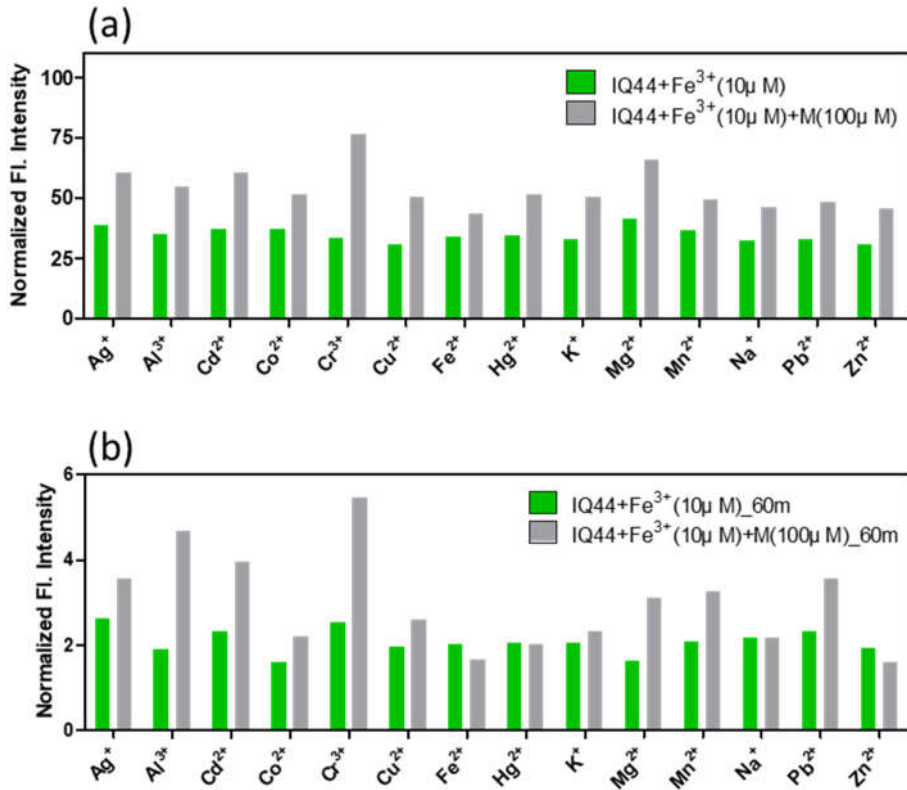


그림 S20. Competitive studies of the IQ44 (2 μ M) in ethanol(a) and DW(b) upon the addition of various metal ions. Green bars indicate the fluorescence response of IQ44 to Fe³⁺ (10 μ M). Grey bars represent the addition of different metal ions (100 μ M) in the presence of Fe³⁺ ion, respectively; $\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm, slit width = 3 nm / 5 nm

3.4 Dissociation constant between IQ44 and Fe^{3+}

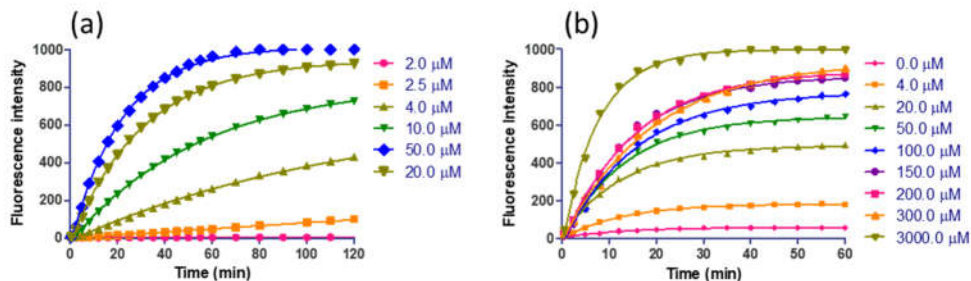


그림 S21. Fluorescence intensity at 450 nm of IQ44 along the addition of Fe^{3+} in ethanol(a), H_2O (b); $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, slit width = 3 nm / 5 nm

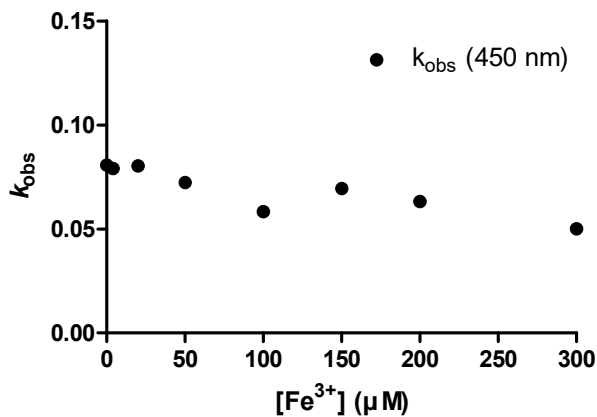


그림 S22. Observed rate constant (k_{obs}) against $[\text{Fe}^{3+}]$ in DW

3.5 NMR spectrum

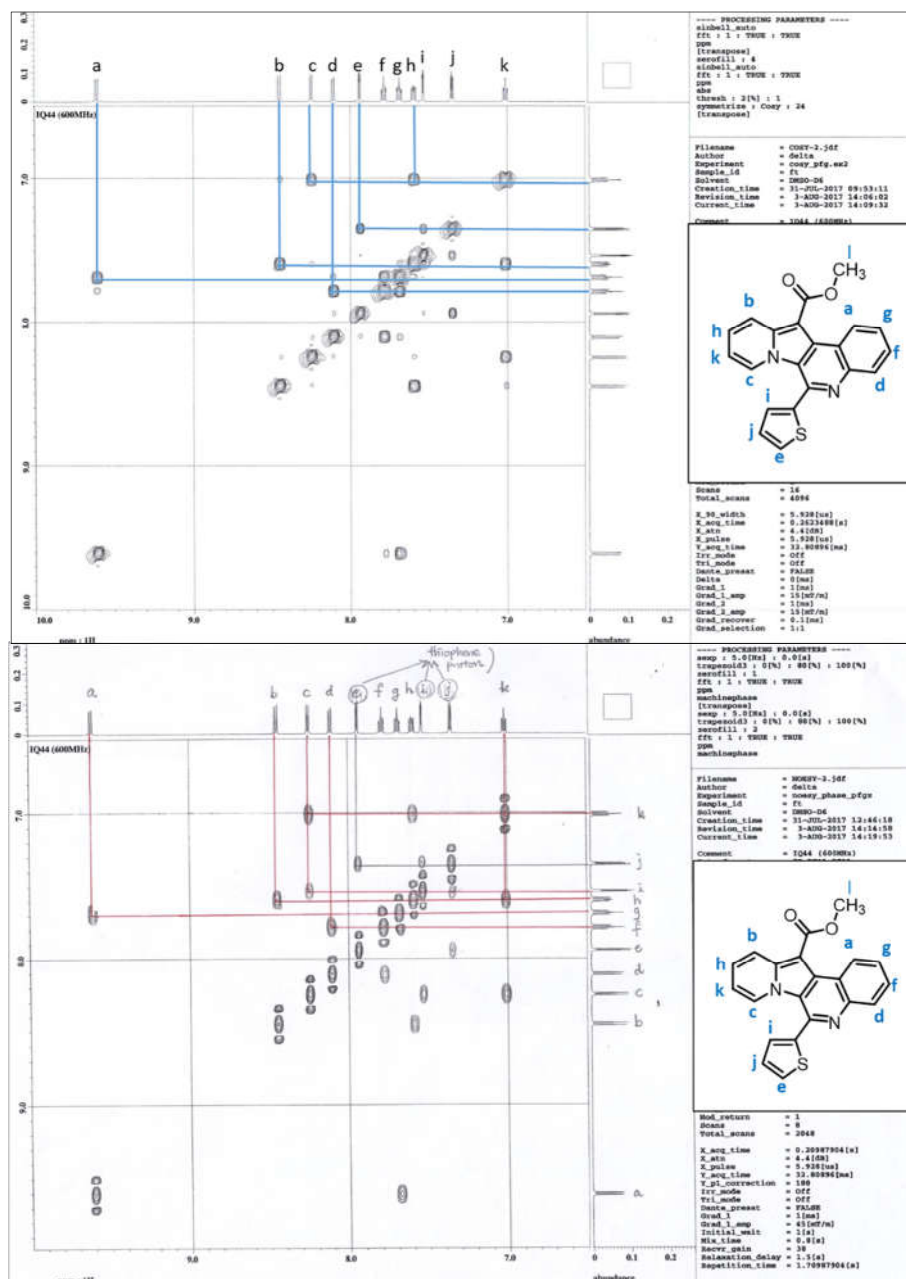


그림 S23. ^1H - ^1H COSY(a), NOESY(a) spectrum of IQ44 in DMSO- d_6

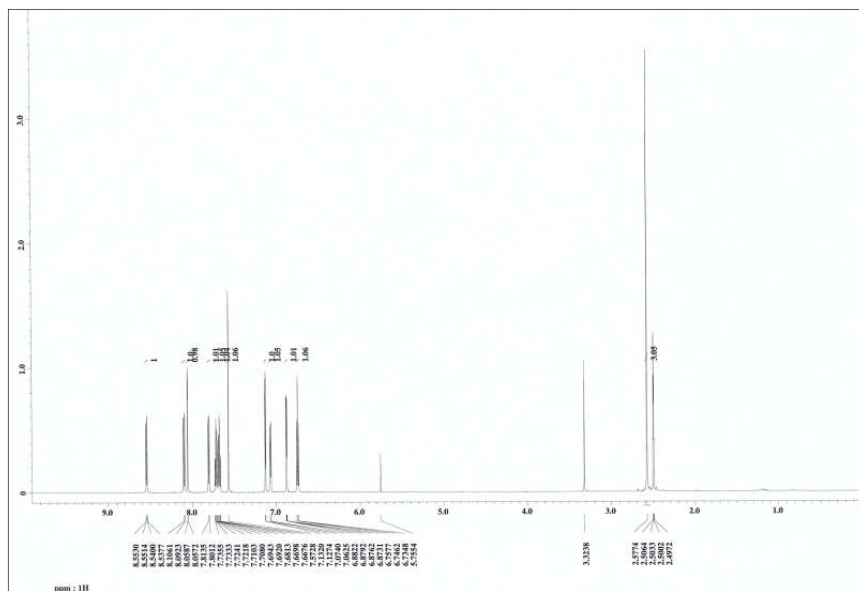
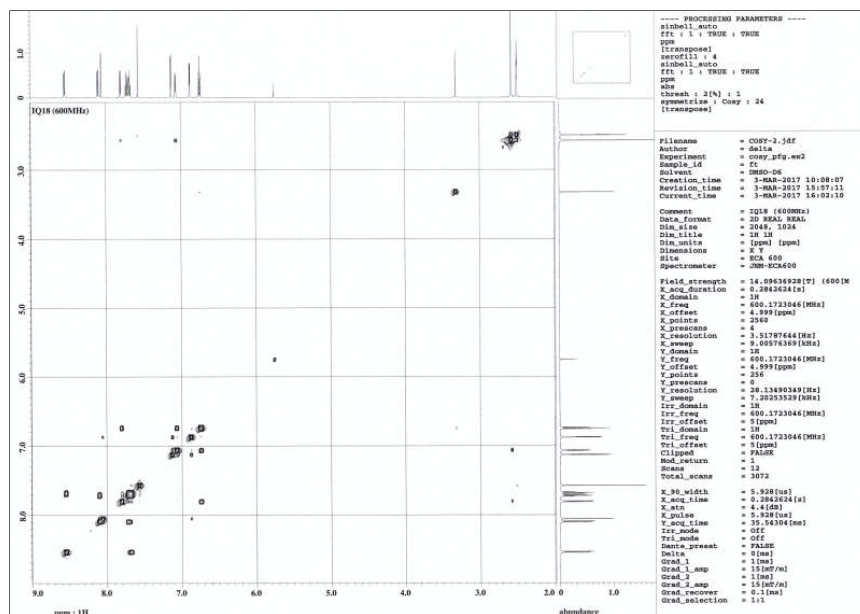
표 S1. Gap of chemical shift between IQs and IQ-Fe complex

	¹ H	IQ18	IQ18 -Fe	Shift	¹ H	IQ44	IQ44- Fe	Shift
Indolizine	d	7.81	8.18	0.37	c	8.25	8.07	-0.18
	g	7.57	7.89	0.32	b	8.45	8.50	0.05
	i	7.07	7.52	0.45	h	7.60	7.80	0.20
	k	6.75	7.11	0.36	k	7.01	7.17	0.16
Quinoline	a	8.54	8.65	0.11	a	9.61	9.62	0.01
	b	8.10	8.16	0.06	d	8.11	8.24	0.13
	e	7.73	7.89	0.16	f	7.79	7.91	0.12
	f	7.68	7.83	0.15	g	7.69	7.80	0.11
E-ring	c	8.06	8.38	0.32	e	7.94	8.10	0.16
	h	7.13	7.66	0.53	i	7.54	7.70	0.16
	j	6.88	7.11	0.23	j	7.35	7.44	0.09

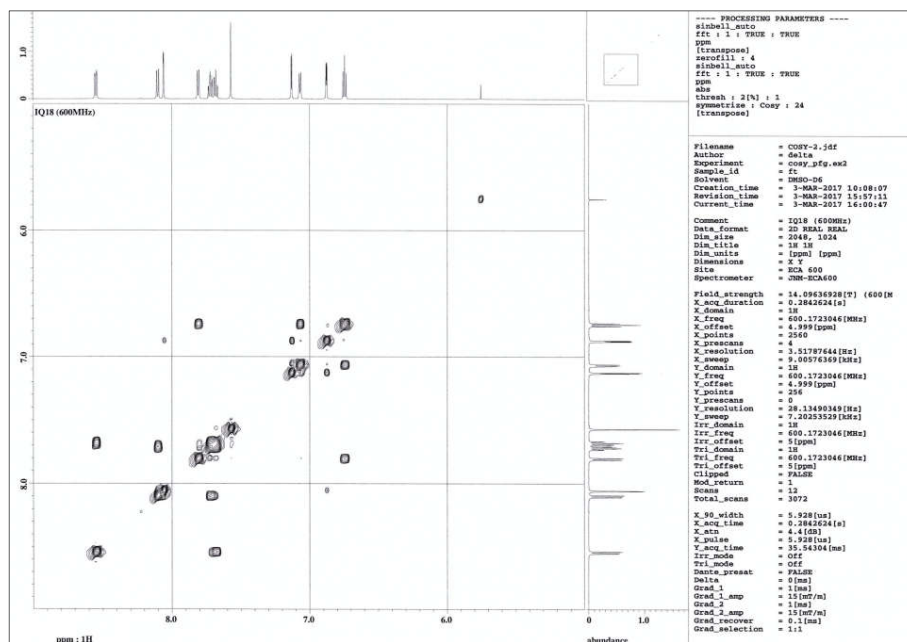
(단위: ppm)

APPENDIX

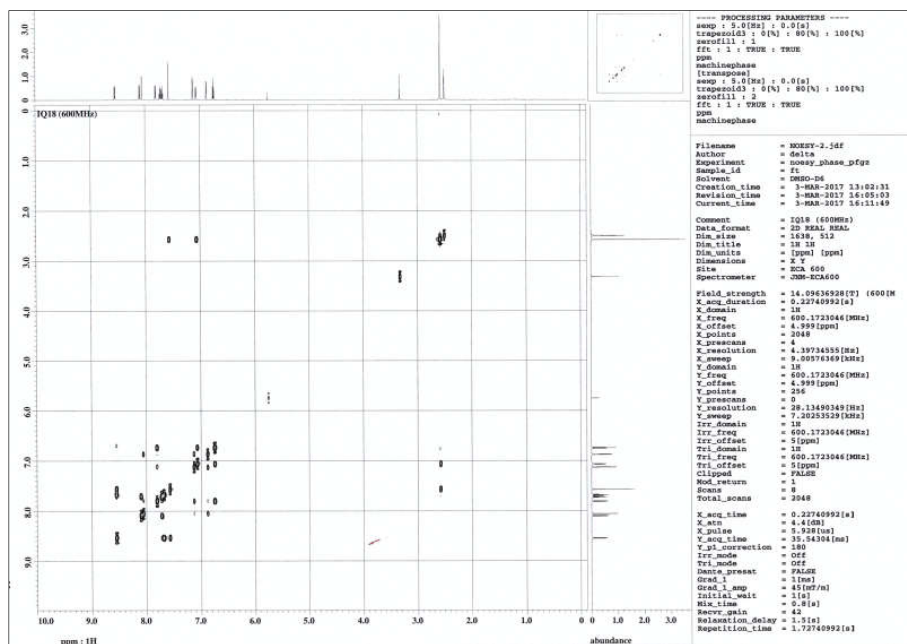
1. Original NMR spectra

¹H NMR of compound IQ18 (600 MHz, DMSO-*d*₆)¹H-¹H COSY NMR of compound IQ18 (600 MHz, DMSO-*d*₆)

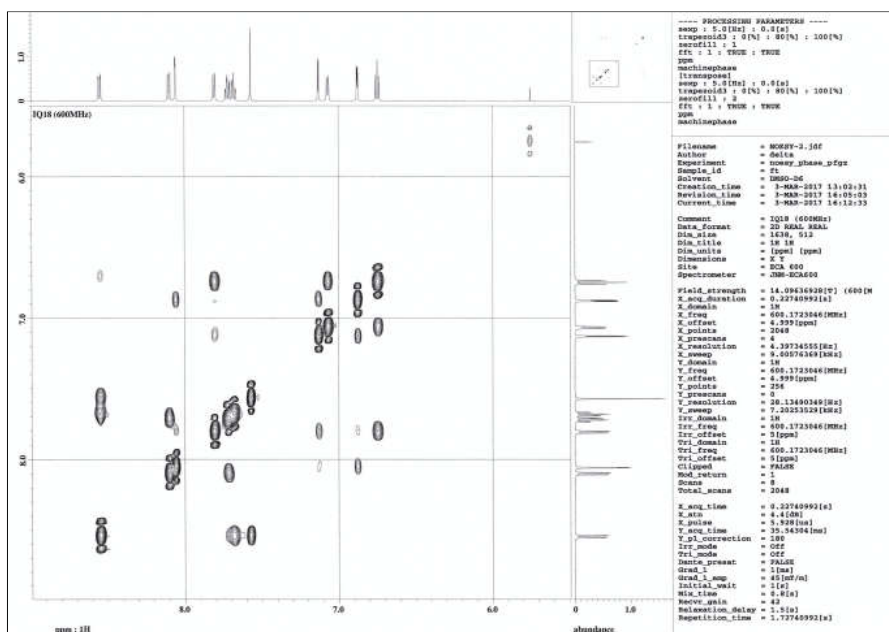
^1H – ^1H COSY NMR of compound IQ18 (range: 9.0–5.0 ppm)

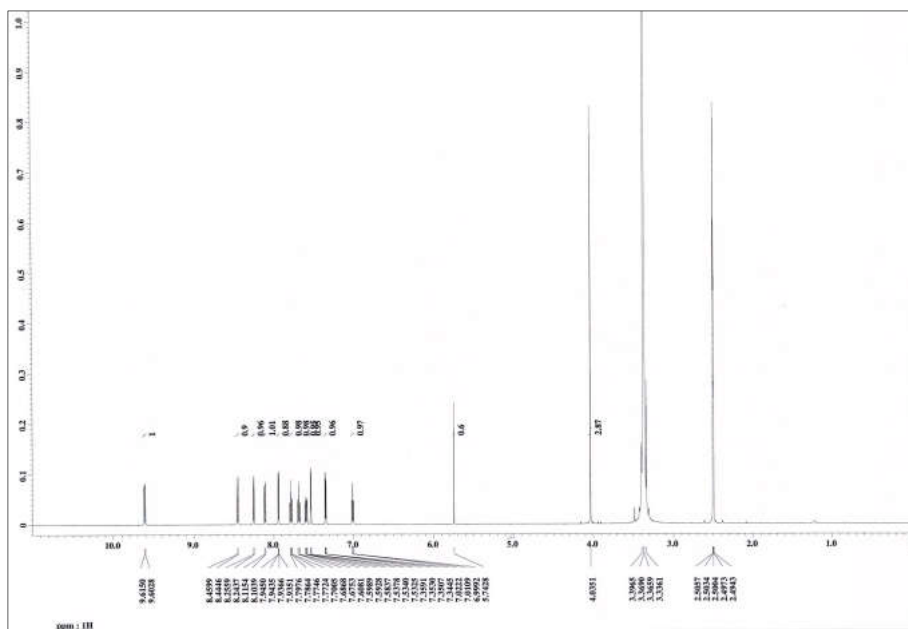
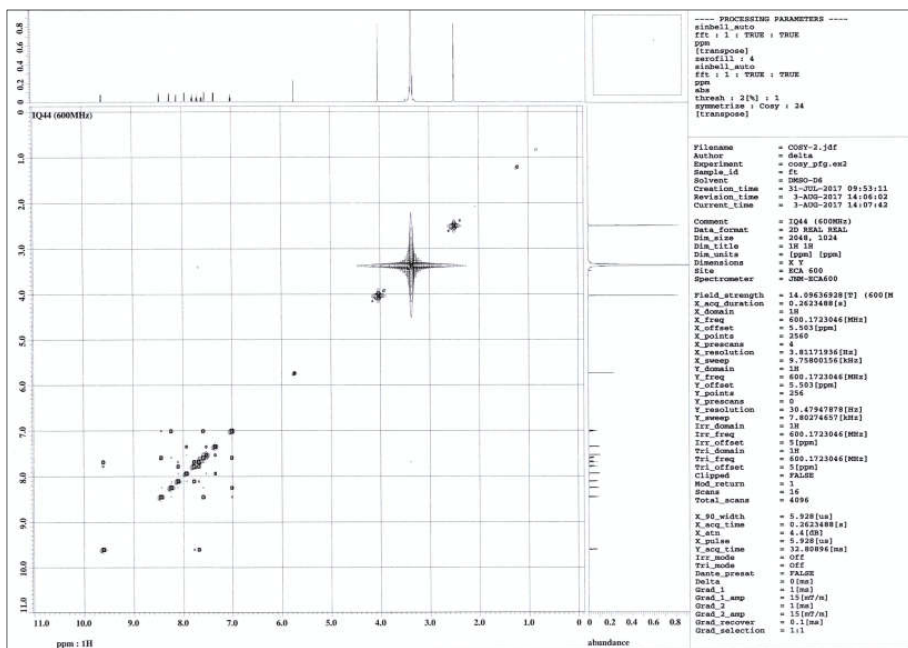


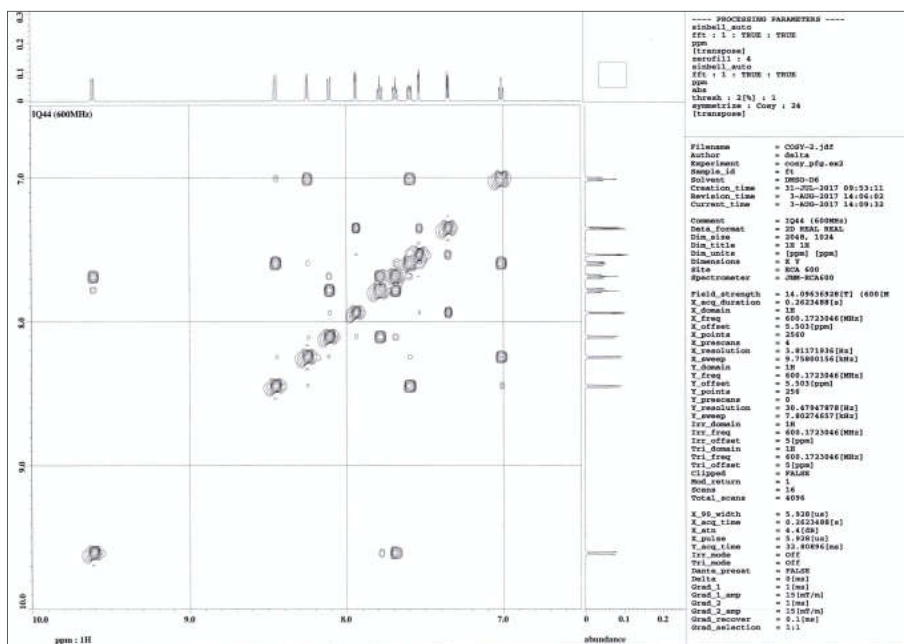
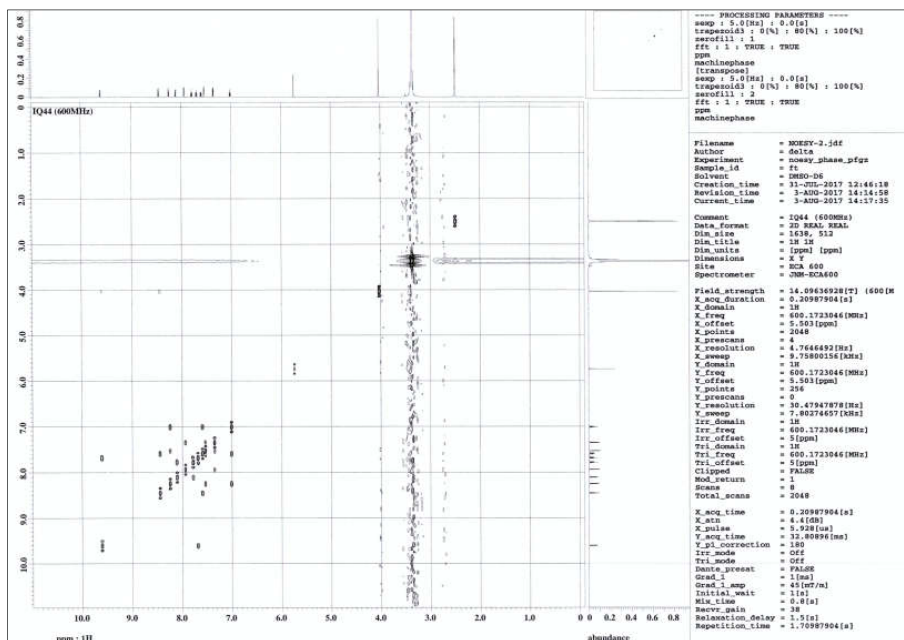
^1H – ^1H NOESY NMR of compound IQ18 (600 MHz, DMSO– d_6)



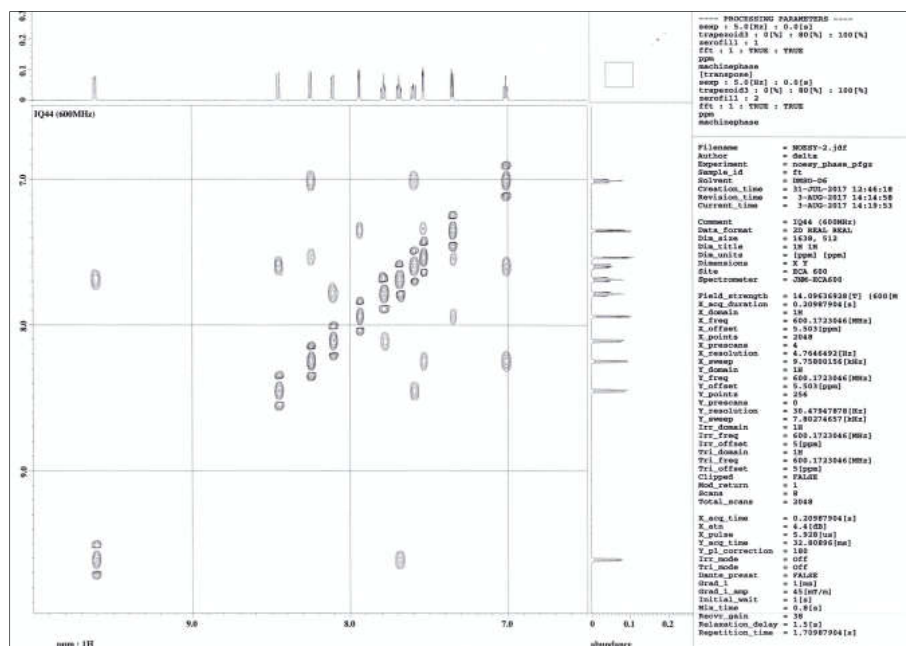
^1H - ^1H NOESY NMR of compound IQ18 (range: 9.0–5.5 ppm)



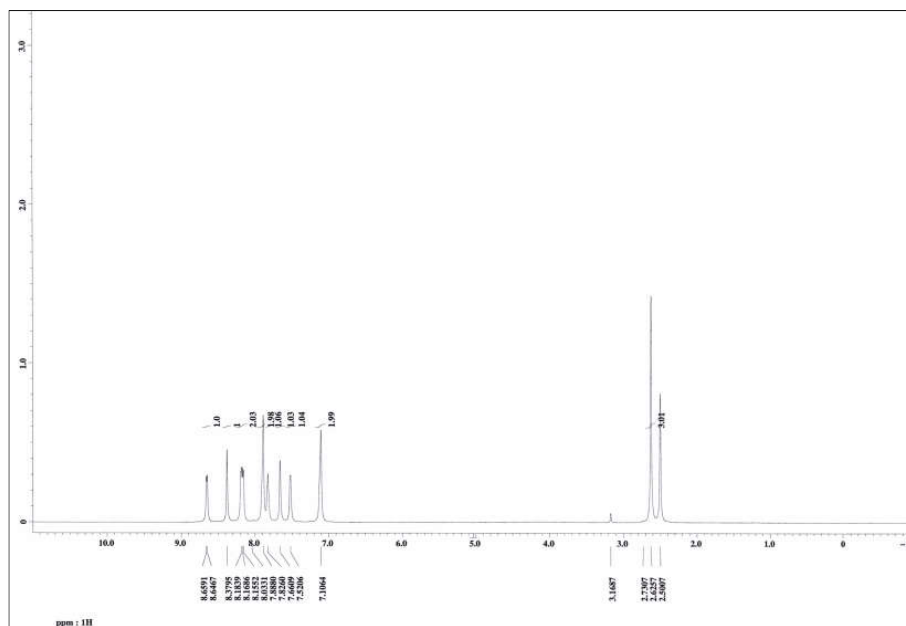
¹H NMR of compound IQ44 (600 MHz, DMSO-*d*₆)¹H-¹H COSY NMR of compound IQ44 (600 MHz, DMSO-*d*₆)

^1H - ^1H COSY NMR of compound IQ44 (range: 10.0–6.5 ppm) ^1H - ^1H NOESY NMR of compound IQ44 (600 MHz, DMSO- d_6)

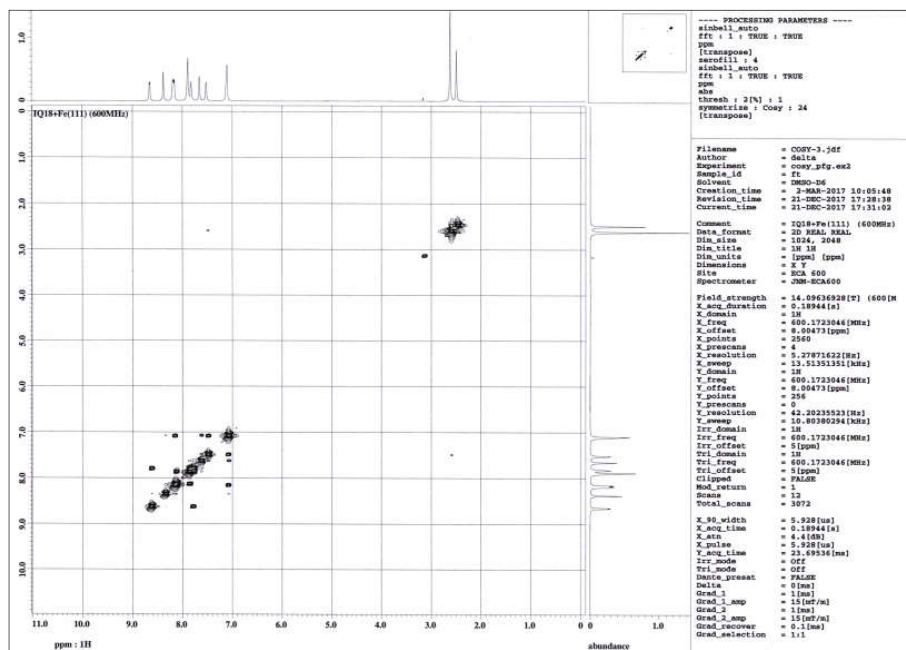
^1H – ^1H NOESY NMR of compound IQ44 (range: 10.0–6.5 ppm)

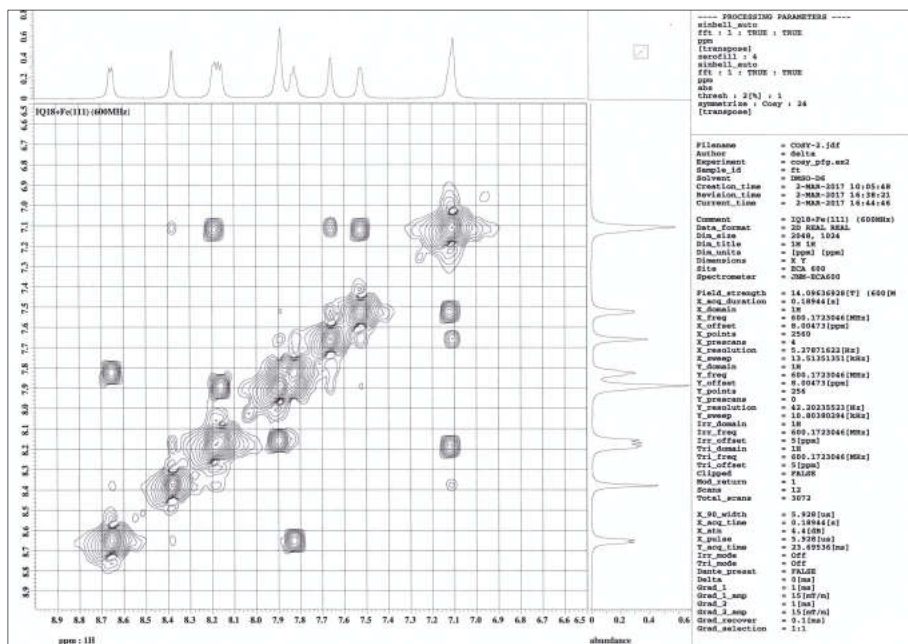
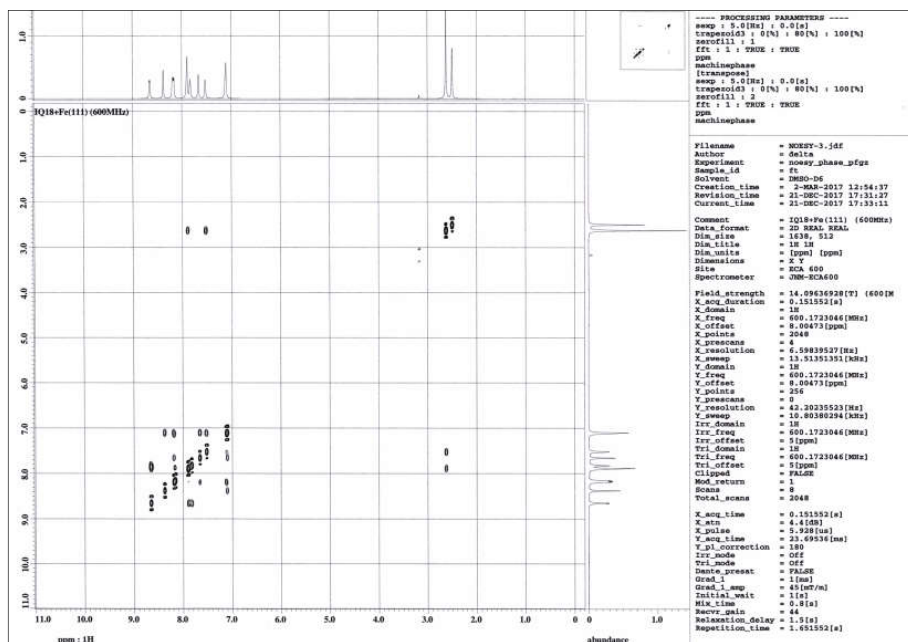


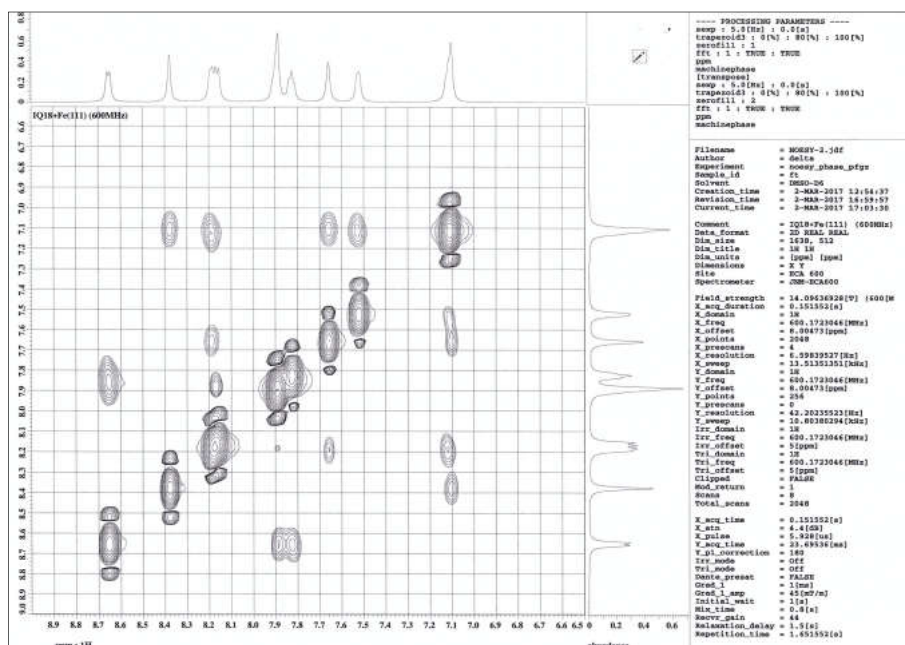
^1H NMR of compound IQ18-Fe (600 MHz, DMSO- d_6)



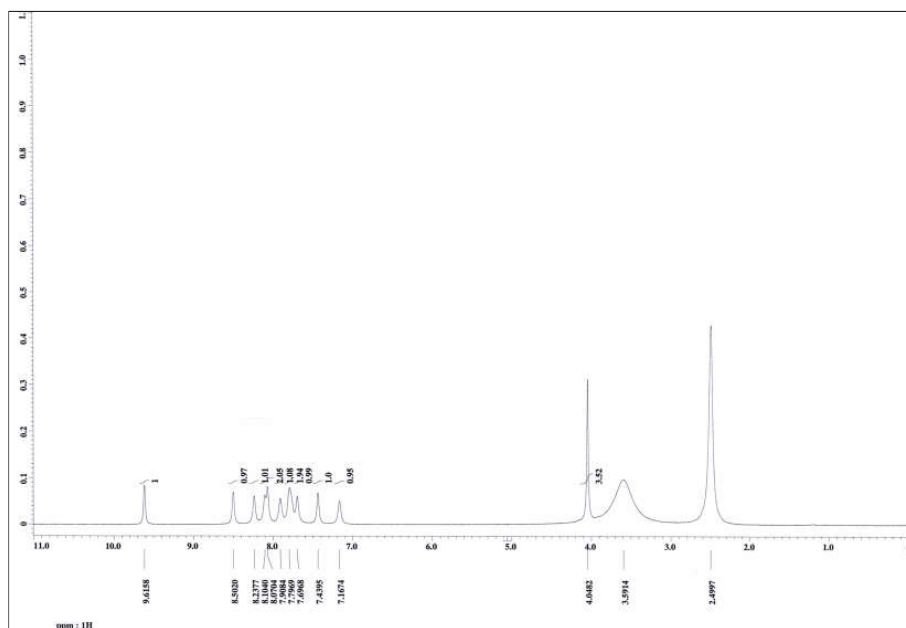
^1H - ^1H COSY NMR of compound IQ18-Fe (600 MHz, DMSO- d_6)



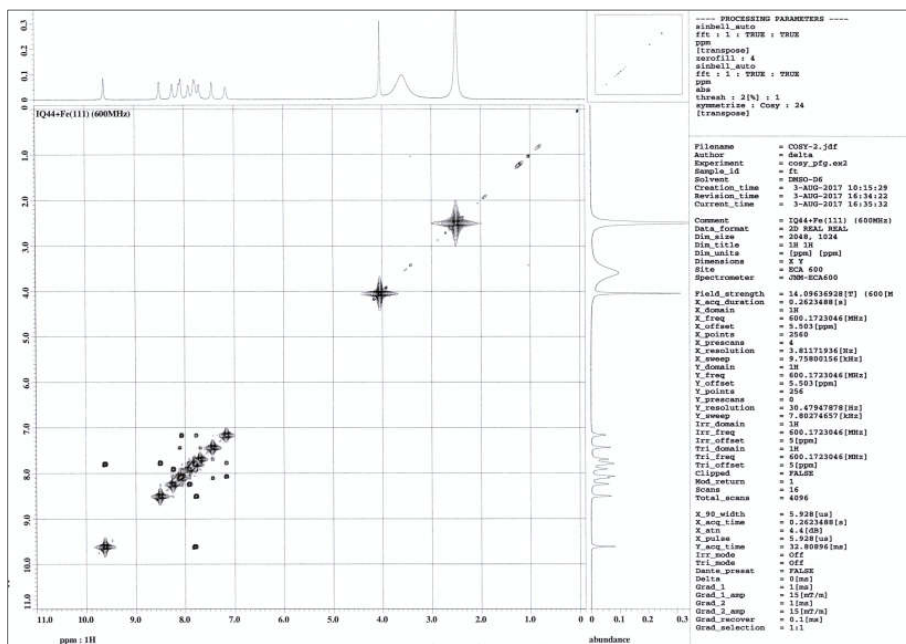
^1H - ^1H COSY NMR of compound IQ18-Fe (range: 9.0–6.5 ppm)¹H-¹H NOESY NMR of compound IQ18-Fe (600 MHz, DMSO-*d*₆)

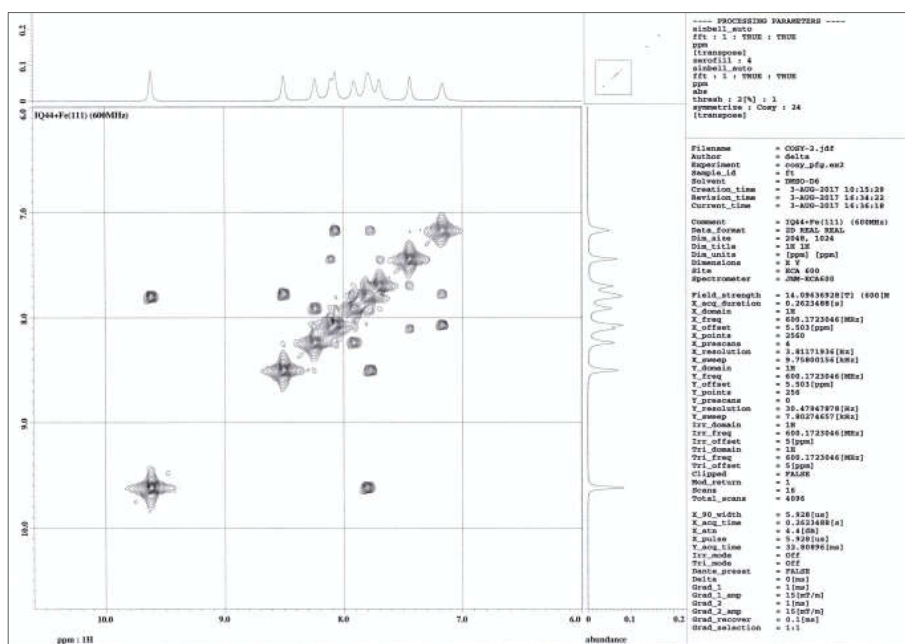
¹H-¹H NOESY NMR of compound IQ18-Fe (range: 9.0–6.5 ppm)

^1H NMR of compound IQ44-Fe (600 MHz, DMSO- d_6)

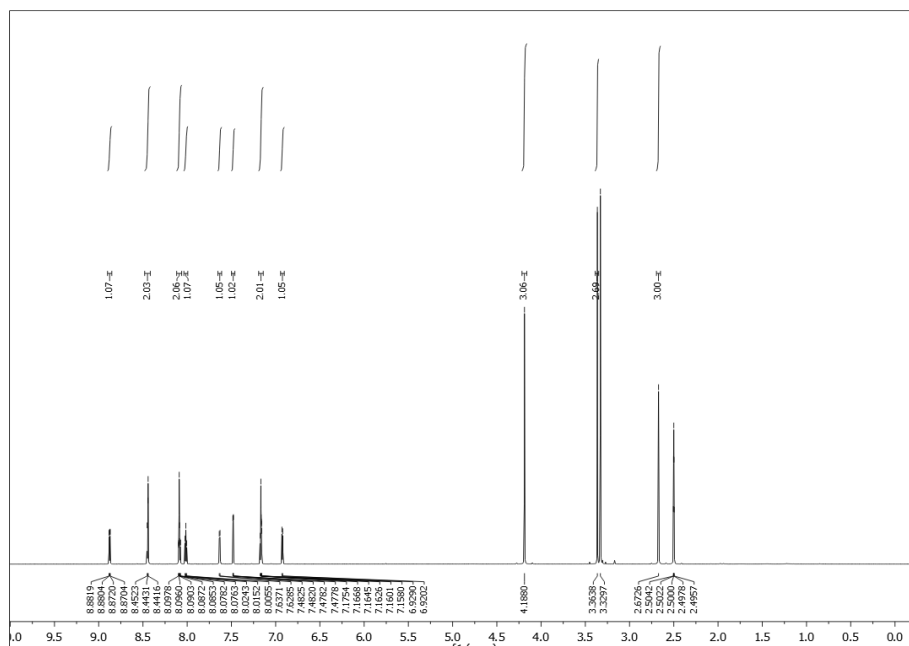


^1H - ^1H COSY NMR of compound IQ44-Fe (600 MHz, DMSO- d_6)

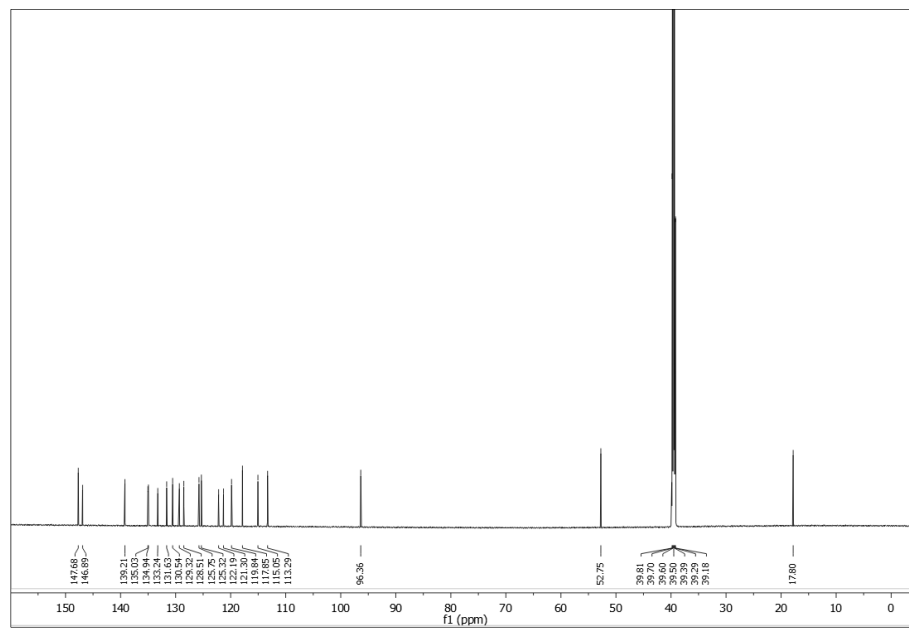


¹H-¹H COSY NMR of compound IQ44-Fe (range: 10.6–6.0 ppm)

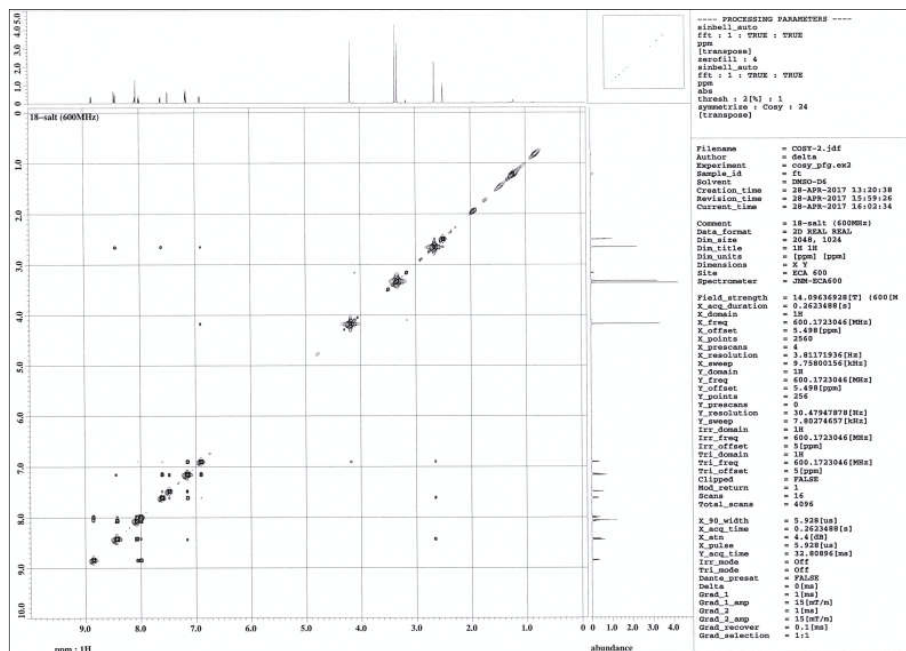
^1H NMR of compound IQ18-S (800 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)



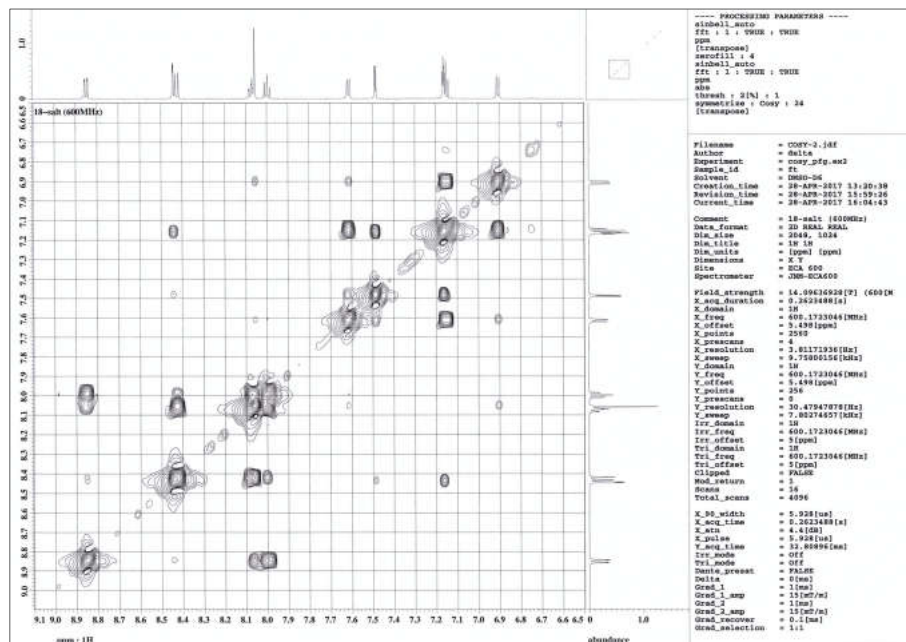
^{13}C NMR of compound IQ18-S (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)



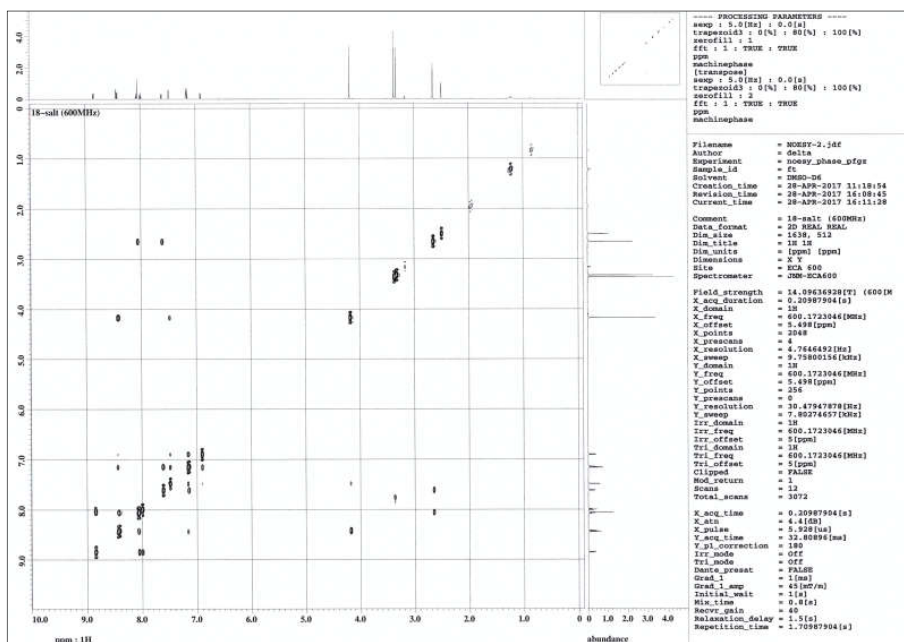
^1H - ^1H COSY NMR of compound IQ18-S (600 MHz, DMSO- d_6)



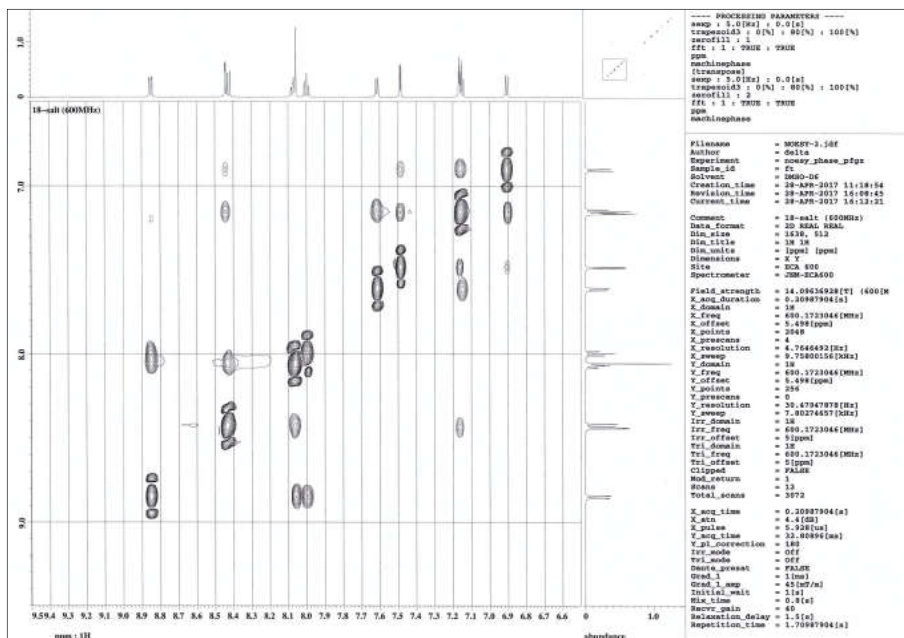
^1H - ^1H COSY NMR of compound IQ18-S (range: 9.1–6.5 ppm)



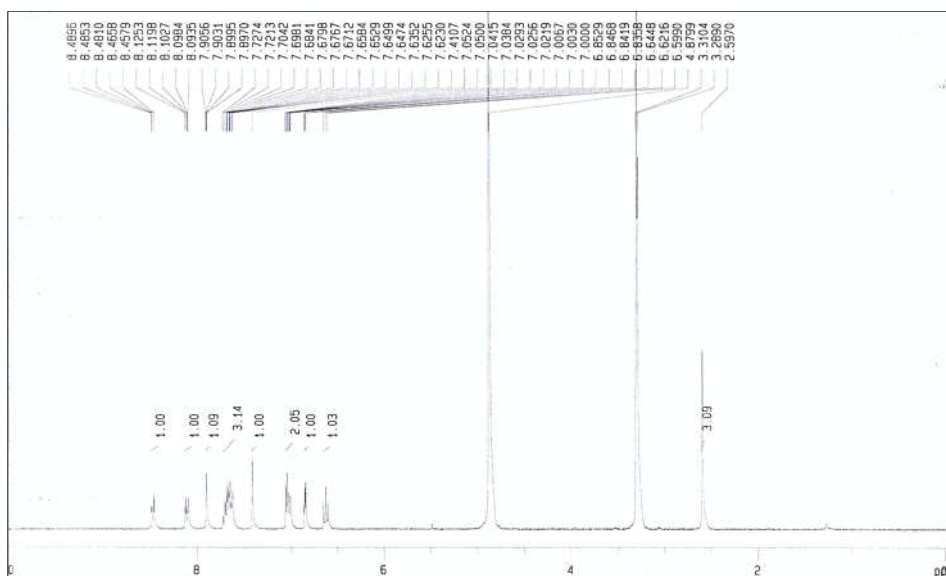
^1H – ^1H NOESY NMR of compound IQ18–S (600 MHz, DMSO– d_6)



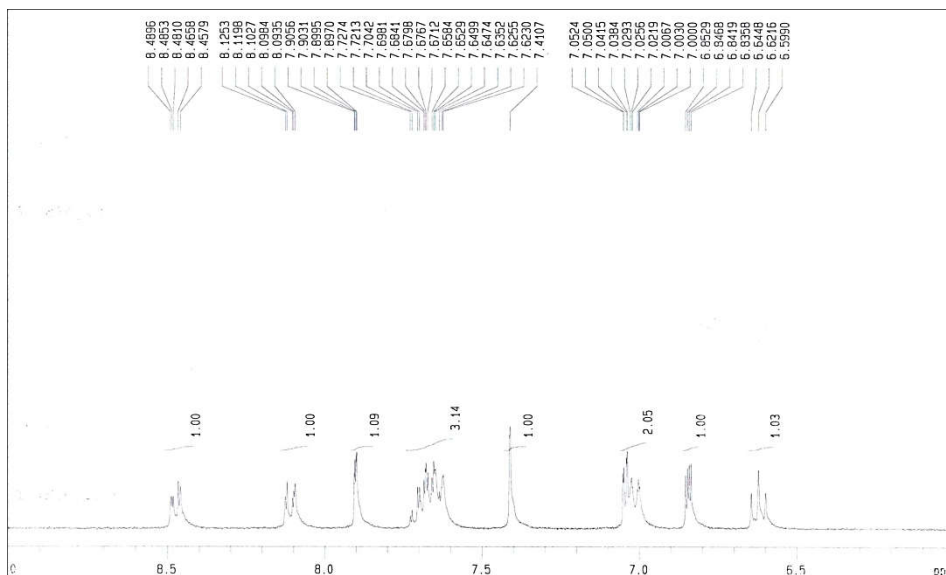
^1H – ^1H NOESY NMR of compound IQ18–S (range: 9.5–6.5 ppm)



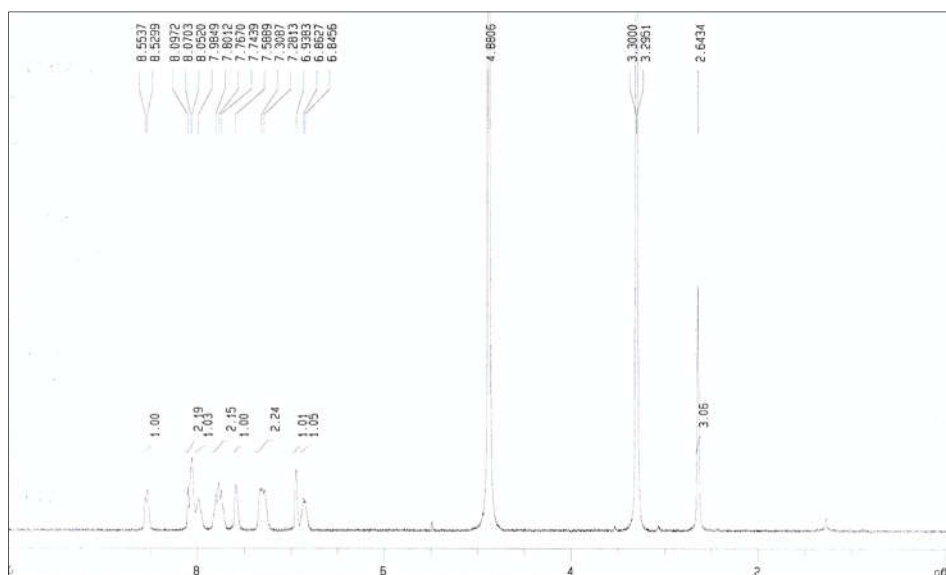
^1H NMR of IQ18 with 0 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



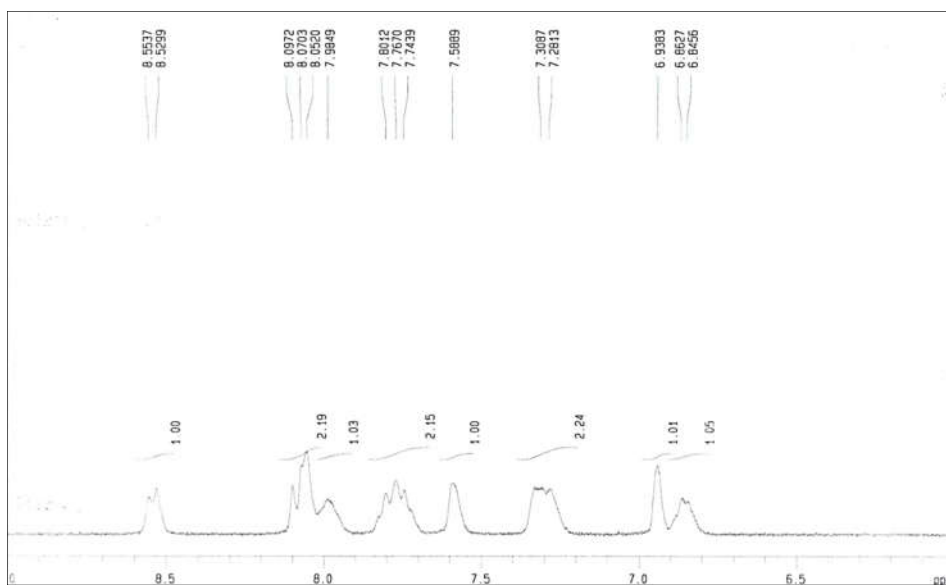
^1H NMR of IQ18 with 0 eq. of Fe^{3+} (range: 9.0–6.0 ppm)



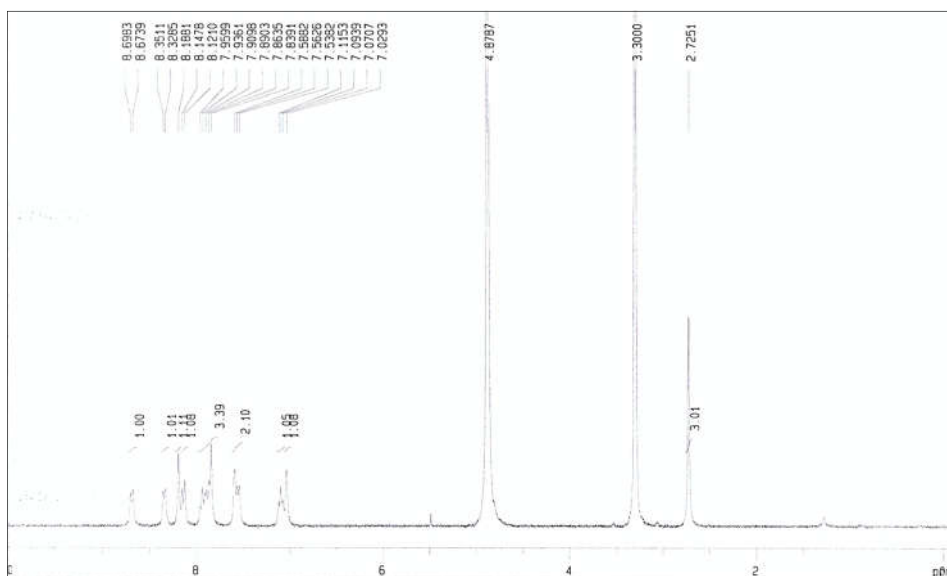
^1H NMR of IQ18 with 0.25 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



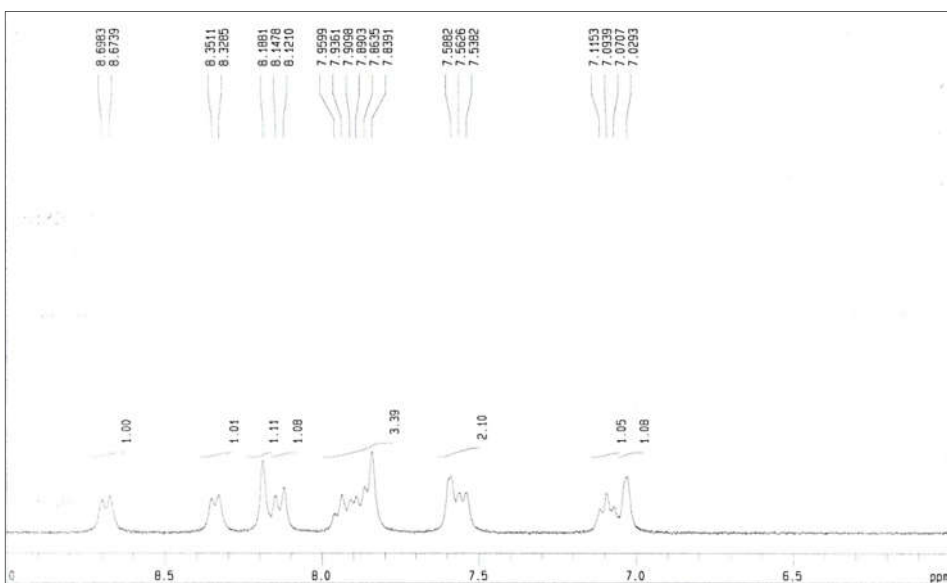
^1H NMR of IQ18 with 0.25 eq. of Fe^{3+} (range: 9.0–6.0 ppm)



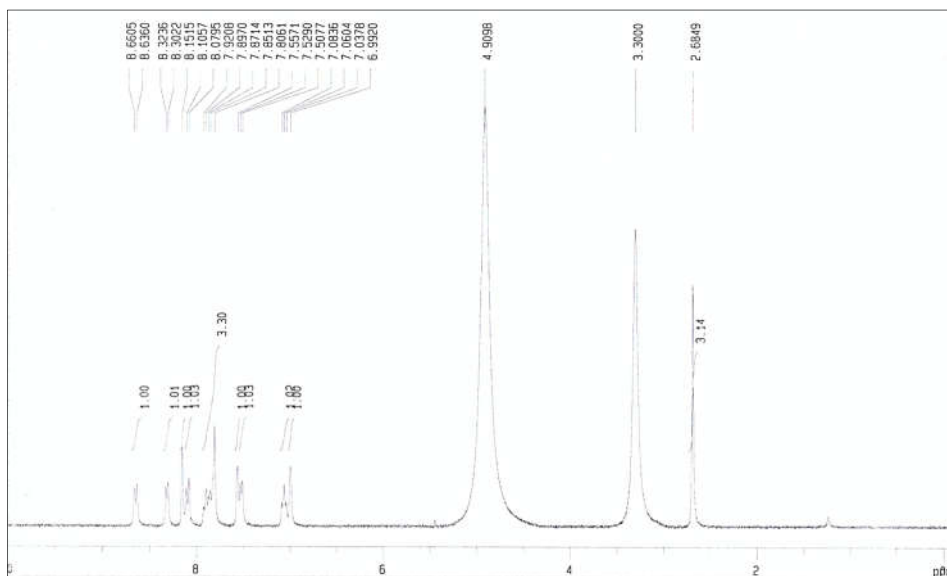
^1H NMR of IQ18 with 0.5 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



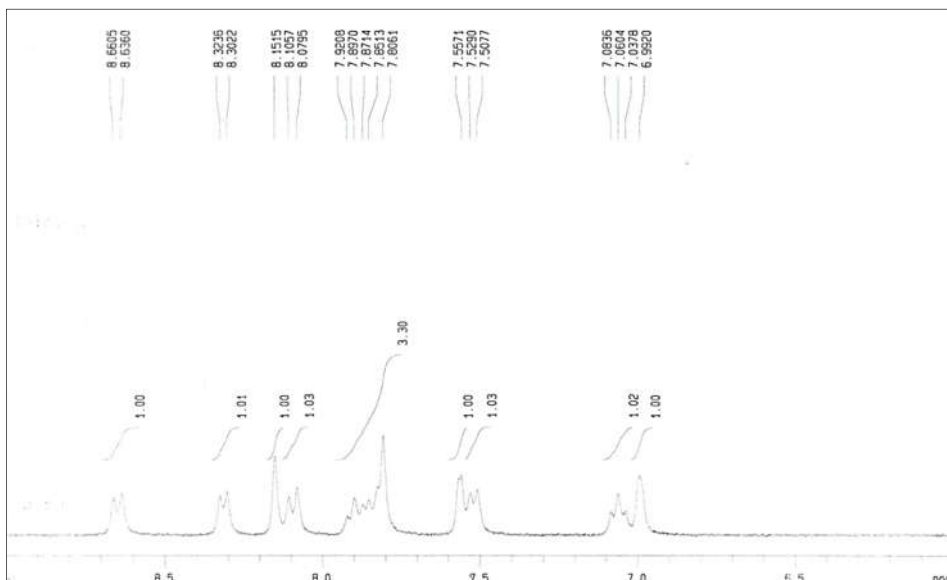
^1H NMR of IQ18 with 0.5 eq. of Fe^{3+} (range: 9.0–6.0 ppm)



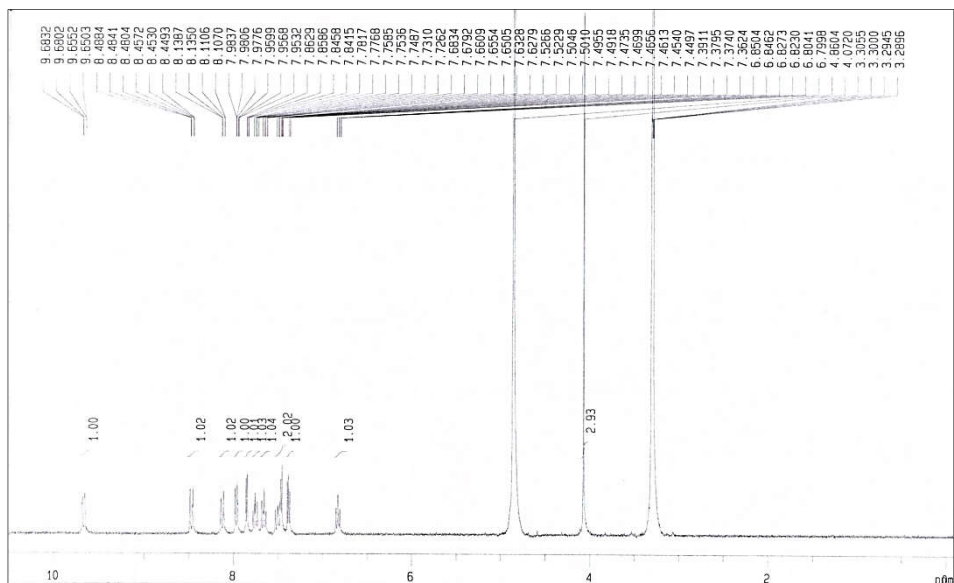
^1H NMR of IQ18 with 1.0 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



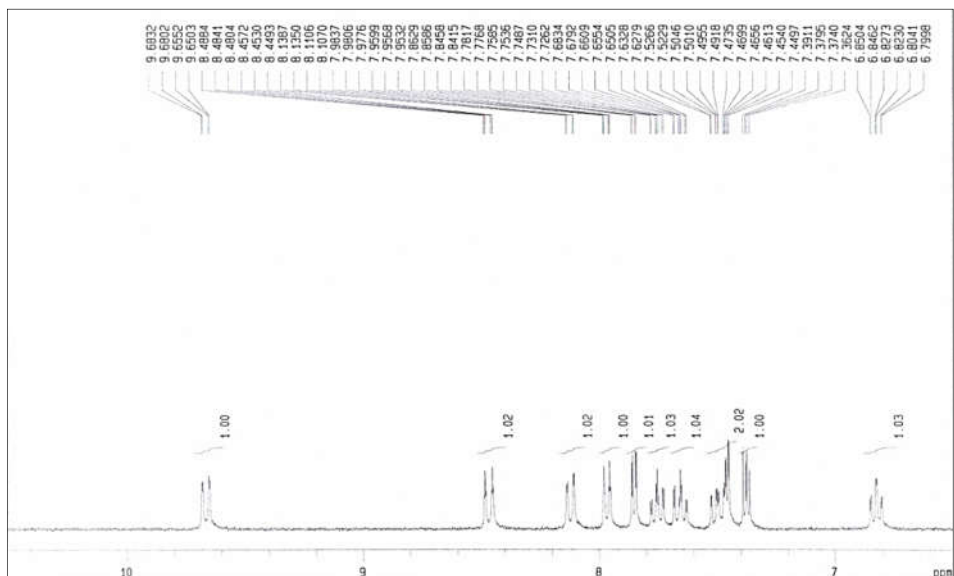
^1H NMR of IQ18 with 1.0 eq. of Fe^{3+} (range: 9.0–6.0 ppm)



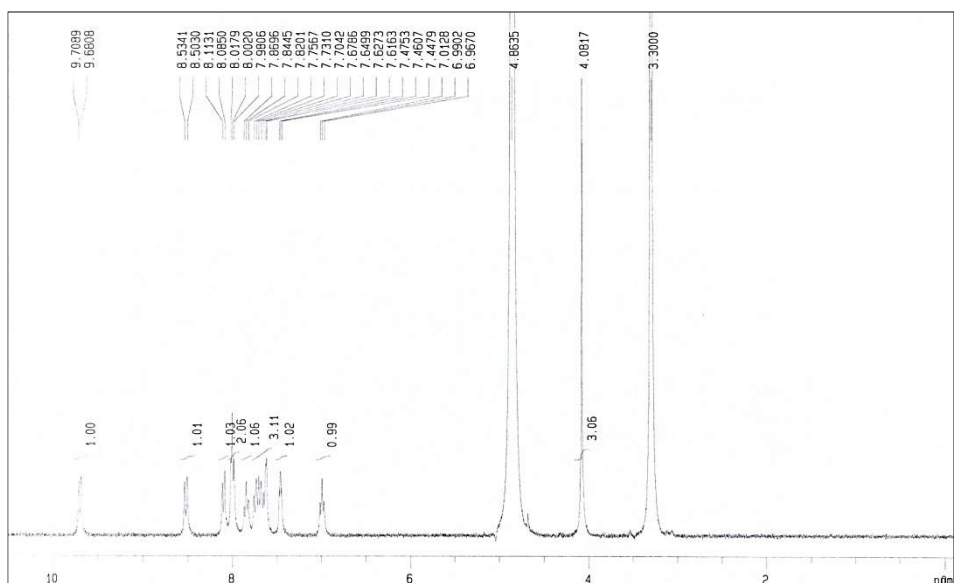
^1H NMR of IQ44 with 0 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



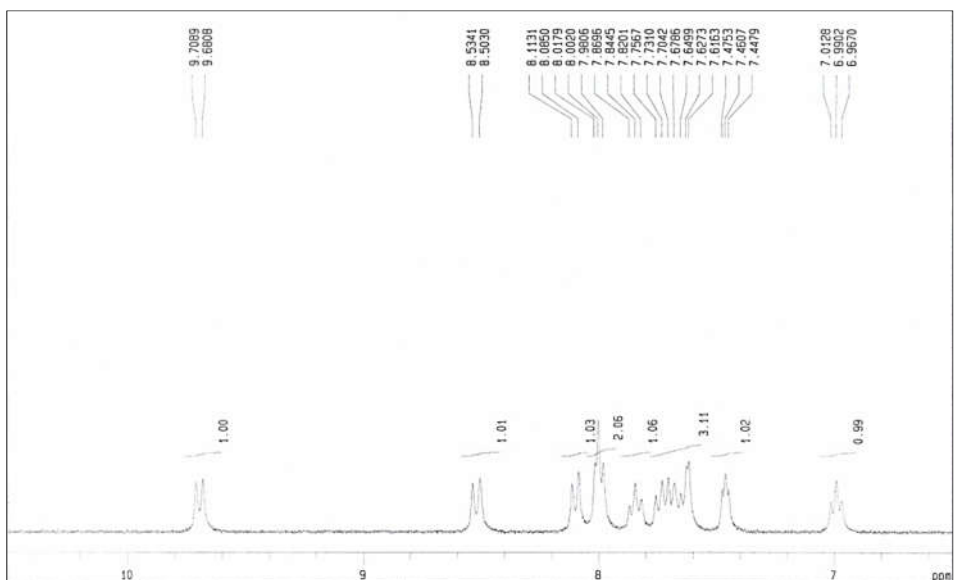
^1H NMR of IQ44 with 0 eq. of Fe^{3+} (range: 10.5–6.5 ppm)



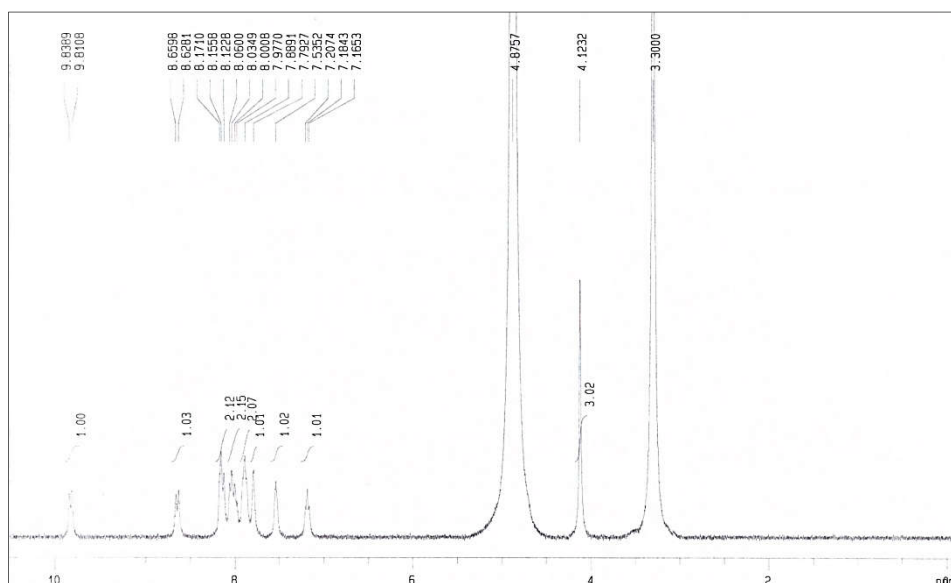
^1H NMR of IQ44 with 0.25 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



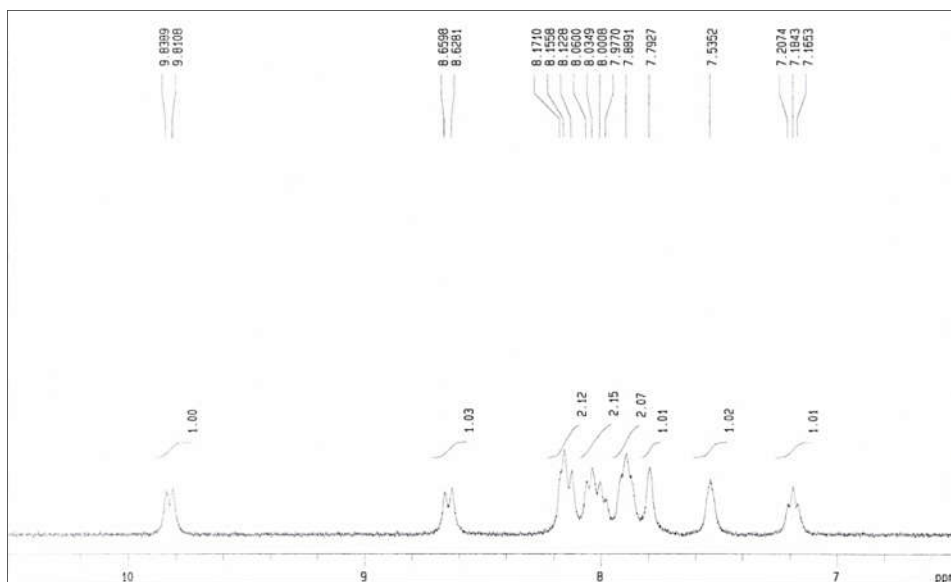
^1H NMR of IQ44 with 0.25 eq. of Fe^{3+} (range: 10.5–6.5 ppm)



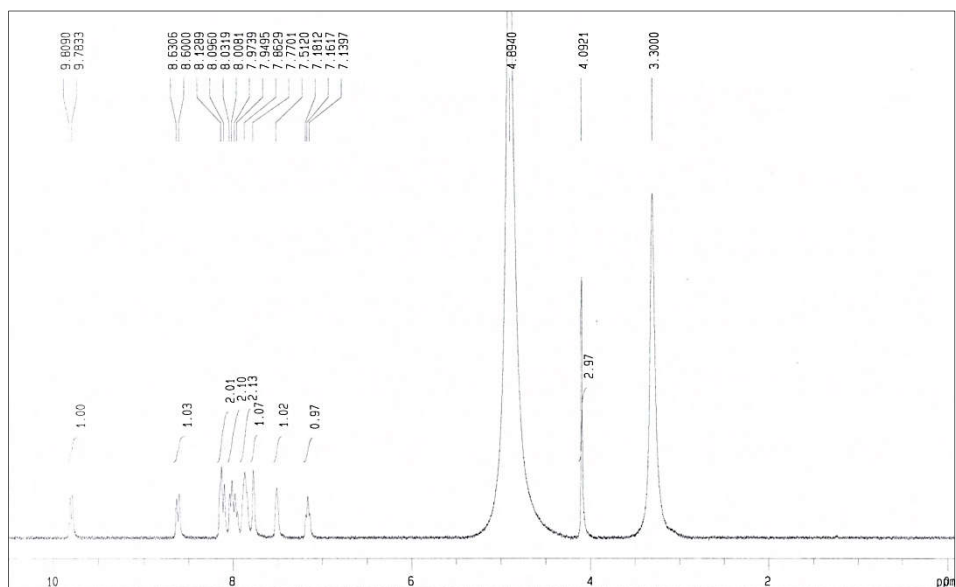
^1H NMR of IQ44 with 0.5 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



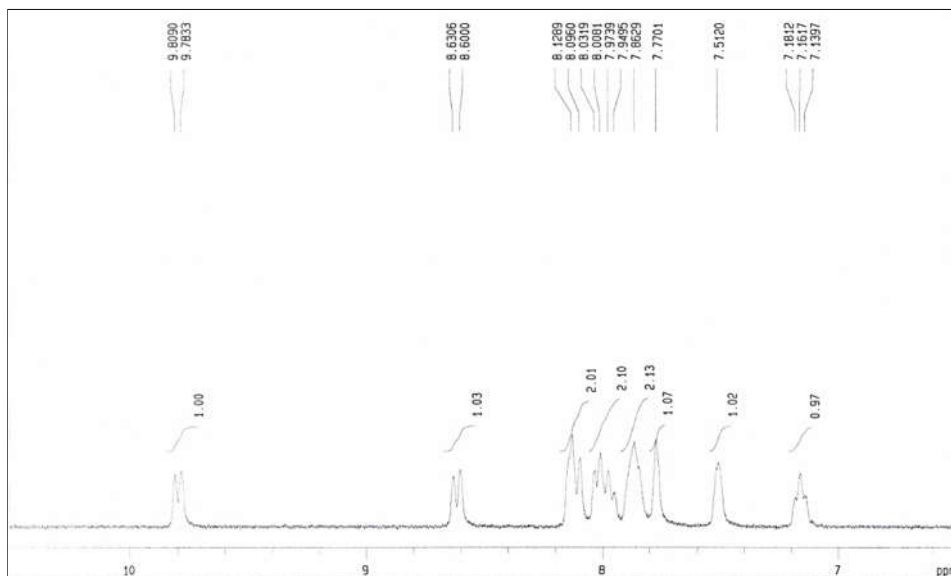
^1H NMR of IQ44 with 0.5 eq. of Fe^{3+} (range: 10.5–6.5 ppm)



^1H NMR of IQ44 with 1.0 eq. of Fe^{3+} (300 MHz, CD_3OD)



^1H NMR of IQ44 with 1.0 eq. of Fe^{3+} (range: 10.5–6.5 ppm)



Abstract

The development of Fe(III) selective fluorescent sensors based on indolizino[3,2-c]quinoline scaffold

Byungyeob Baek

College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Chemical sensors, such as colorimetric and fluorescent sensors, have more advantages than other analytical methods: such as electrochemical, inductively coupled plasma emission spectroscopy, inductively coupled plasma mass spectroscopy and atomic absorption spectroscopy. Fluorescent sensors can have high selectivity, eidetic recognition, real time monitoring, and rapid response while other methods require complex procedures and expensive instruments. Among the heavy metal ions, iron is one of the most important metal ions because iron is the most abundant transition element in the human body and plays an important function in a wide range of biological processes. The discrimination of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions is one of the major requirements in the development of chemical sensors detecting iron metal ions. Therefore, effective chemosensors for the detection of Fe^{3+} have been pursued in various fields of analysis.

Most of fluorescent chemosensors developed so far, however, are limited to rhodamin, fluorescein, and Cyanine derivatives.

Our lab reported that indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ) derivatives, a new fluorescent scaffold, have various fluorescence spectra along the change of functional group. In this study, new fluorescent chemosensors based on indolizino[3,2-*c*]quinoline were developed and characterized to distinguish Fe^{3+} from Fe^{2+} by observing changes in the fluorescent spectra. Our results revealed that IQ derivatives could be tuned to work as turn-off or turn-on fluorescent sensors by modifying the functional groups at specific positions. Moreover, the substituent at the C6 position of the IQ sensor is critical for the selectivity toward Fe^{3+} .

We expect that indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ) derivatives developed in this work could be used as fluorescent sensors in biological applications such as cell imaging.

Key word: Fluorescent sensor, Chemical sensor,
indolizino[3,2-*c*]quinoline (IQ), Fe^{3+}

Student Number: 2016-21823